

CHARAKTERISIERUNG
UND SYSTEMATISIERUNG
EINES KAMELPOCKENVIRUS

GERHARD BARTENBACH

1973



Dipl.-Kfm. A. Koch
(Kurfürstendruck)
8 München 23
Clemensstraße 27
Telefon 342149



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553805_0039

Aus dem Institut für Mikrobiologie und
Infektionskrankheiten der Tiere
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof.Dr.Dr.h.c. A. Mayr

CHARAKTERISIERUNG UND SYSTEMATISIERUNG
EINES KAMELPOCKENVIRUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von
Gerhard Bartenbach
aus
Gaildorf

München 1973

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München



Dekan: Professor Dr. E. Dahme
Referent: Professor Dr.Dr.h.c. A. Mayr
Korreferent: Privatdozent Dr. E. Munz

Tag der Promotion: 23. Februar 1973

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	Seite 1
2. SCHRIFTTUM	2
2.1. Kamelpocken	2
2.1.1. Geschichtliches	2
2.1.2. Vorkommen und Verbreitung	2
2.1.3. Eigenschaften des Erregers	3
2.1.4. Epizootologie	4
2.1.5. Pathogenese	5
2.1.6. Immunologie	5
2.1.7. Klinik	6
2.1.8. Bekämpfung	7
2.2. Erreger von Pockenerkrankungen bei Wiederkäuern	8
2.2.1. Gliederung und Virusarten	8
2.2.2. Eigenschaften	8
2.2.3. Immunologische und serologische Beziehungen	15
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	17
3.1. Material und Methoden	17
3.1.1. Virusstämme	17
3.1.2. Zellkulturen und Kulturmedien	18
3.1.3. Züchtung im Hühnerbrutei	19

3.1.4. Virustitrationen	19
3.1.5. Plaqueteste	19
3.1.6. Prüfung des Kamelpockenvirus auf Züchtbarkeit und Cytopathogenität in verschiedenen Zellarten	21
3.1.7. Untersuchung auf Einschlußkörperchen	21
3.1.8. Äther-Resistenztest	22
3.1.9. Antiseren	22
3.1.10. Hämagglutinationsteste	23
3.1.11. Hämagglutinationshemmungsteste	23
3.1.12. Neutralisationsteste	24
3.1.13. Tierversuche	25
3.1.14. Elektronenmikroskopie	26
3.2. Versuche und Ergebnisse	27
3.2.1. Morphologie	27
3.2.2. Züchtung im Hühnerbrutei	27
3.2.2.1. Morphologie der CAM- Veränderungen	29
3.2.2.2. Pathogenese	29
3.2.2.3. Herdentwicklung und Vermehrungsintensität	29
3.2.2.4. Haftung am Entoderm	31
3.2.3. Züchtung in Zellkulturen	31
3.2.3.1. Zellspektrum des Kamel- pockenvirus	31
3.2.3.2. Vermehrungsintensität	33
3.2.3.3. Plaquebildung	36
3.2.3.4. Einschlußkörperchen	37

3.2.4. Züchtung im Tier	37
3.2.4.1. Kaninchen	37
3.2.4.2. Eintagsküken	38
3.2.4.3. Infantile Maus	38
3.2.4.4. Schaf	39
3.2.5. Hämagglutinin	39
3.2.6. Ätherstabilität	39
3.2.7. Serologische Beziehungen des Kamel- pockenvirus zu den Orthopoxviren	41
3.2.7.1. Kreuzteste in der Hämagglu- tinationshemmungsreaktion	41
3.2.7.2. Kreuzversuche im Neutrali- sationstest	42
3.2.7.3. Kreuzschutztest im Kaninchen	46
4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	49
5. ZUSAMMENFASSUNG	59
6. LITERATURVERZEICHNIS	61

LEBENS LAUF

1. EINLEITUNG

Die Pocken der Kamele sind schon über ein Jahrhundert lang bekannt. Sie treten noch heute epizootisch in vielen Teilen Afrikas und Asiens auf. Von einem Ausbruch im Iran berichteten kürzlich RAMYAR und HESSAMI (62).

Noch nicht geklärt ist bis jetzt, ob die Kamelpocken eine eigenständige Krankheit, ausgelöst durch ein spezifisches Kamelpockenvirus, darstellen oder ob ein bereits bekanntes Pockenvirus auch die Pocken bei Kamelen hervorruft.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb zur Aufgabe gestellt, den Erreger der Kamelpocken zu charakterisieren und speziell die für eine Differenzierung wichtigen biologischen Eigenschaften des Virus zu ermitteln, um es mit anderen, differentialdiagnostisch in Betracht kommenden Pockenvirusarten vergleichen zu können. Die Untersuchungen sollten daneben auch gezielt die Stellung des Kamelpockenvirus, seine Beziehungen zu anderen Pockenvirusarten und seine Einordnung in das System der Pockenviren klären.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Kamelpocken

2.1.1. Geschichtliches

1840 berichtete MASON (40) erstmals über Pocken bei Kamelen. Erst 1909 machte LEESE (29, 30) dann wieder auf die Kamelpocken aufmerksam, und 1917 erschien ein Buch von CROSS (11) über Kamelkrankheiten, in dem ein eigenes Kapitel den Pocken der Kamele gewidmet ist.

In jüngster Zeit wurde über die Erkrankung erneut berichtet (7, 12). Die Klinik der Kamelpocken ist auch dort zwar ausführlich beschrieben, über die Art des Erregers sind aber nur Vermutungen geäußert worden. 1972 isolierten RAMYAR und HESSAMI (62) erstmals das Virus und führten orientierende Untersuchungen über seine Eigenschaften durch.

2.1.2. Vorkommen und Verbreitung

Kamelpocken kommen vor bei den Kamelarten Asiens und Afrikas, also beim Kamel oder Trampeltier (*Camelus bactrianus* L.) und beim Dromedar (*Camelus dromedarius* L.). Pocken bei den südamerikanischen Kameliden (*Lama* und verwandte Arten) wurden bisher nicht beschrieben.

Nach CURASSON (12) treten die Pocken der Kamele und Dromedare in Algerien, in der Sahara, in Ägypten, im Sudan, in Somalia, in Maure-

tanien, im asiatischen Teil der Sowjetunion und in Indien auf. Zum erstenmal beschrieben wurden sie in Indien.

2.1.3. Eigenschaften des Erregers

Über die morphologischen, biologischen und chemisch-physikalischen Eigenschaften des Kamelpockenvirus ist nur relativ wenig bekannt. MASON (40) nahm an, daß der Erreger identisch ist mit dem Virus der Pferde- und Kuhpocken. Nach AMANSCHULOW (1) sollen Kamelpocken auf das Schaf übertragbar sein, eine Haftung am Pferd erschien ihm zweifelhaft.

FINDLEY (21) stellte fest, daß sich der Mensch an erkrankten Tieren mit Kamelpockenvirus infizieren kann. An den Händen und Armen von Pflegern wurden gutartige Eruptionen beobachtet, die eine Immunität gegen das Variolavirus hinterlassen haben sollen.

Nach RAMYAR und HESSAMI (62) sollen unter den Tieren nur Kamele empfänglich sein. Rinder, Schafe, Ziegen, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten, Hamster sowie erwachsene und Babymäuse erwiesen sich nach intradermaler experimenteller Infektion mit Kamelpocken-Kulturvirus und -Ei-virus als refraktär und zeigten keinerlei Reaktionen. Im Hühnerbrutei ließ sich das Virus züchten, wobei bis zum 7. Tag post infectionem (p.inf.) Pockenherde entstanden, die als Vaccinia-ähnlich beschrieben werden.

RAMYAR und HESSAMI gelang auch die Vermehrung des Virus mit einem als gut bezeichneten cytopathischen Effekt in einer Vielzahl von Zell-

arten von Säugern, wie Lammnieren-, Lammhoden-, Kälbernieren-, Kälberhoden-, Schweinenieren-, Vero- (Affennierenstamm), MS- (Affennierenstamm) und BHK 21- (Hamsternierenstamm) Zellen. Nur für Lammnierenkulturen wird mit $10^{6,5} \text{KID}_{50} / \text{ml}$ ein Virusgehalt angeführt, der nach der aufgeführten Vermehrungskurve 96 - 120 Stunden nach der Infektion erreicht wird. In diesen Kulturzellen konnten die Untersucher sowohl intraplasmatische als auch intranukleäre Einschlusskörperchen nachweisen.

Morphologisch ist das Kamelpockenvirus den anderen Pockenviren sehr ähnlich. Als "Durchmesser" werden 270 nm angegeben (62). Dieser Wert dürfte sich auf die lange Achse des Partikels beziehen. Nach einer Behandlung von Kulturvirussuspensionen mit 20 Volumenprozent Äthyläther (bei 4°C über Nacht) und mit 5 % Chloroform wurden Titerverluste von mehr als 4 Zehnerpotenzen festgestellt, das Kamelpockenvirus deshalb als äther- und chloroformlabil eingestuft. Nach Erwärmung des Virus bei 56°C über 15 Minuten ließ sich keine Infektiosität mehr nachweisen (wärmelabil). Auch gegen pH 3 war das Virus empfindlich (säurelabil) (62).

2.1.4. Epizootologie

Die Übertragung der Krankheit erfolgt durch Kontakt. Sie breitet sich rasch in den Kamelbeständen aus. Seuchenausbrüche werden alle 3 - 5 Jahre beobachtet, meist in der feuchtwarmen Jahreszeit (7, 12).

2.1.5. Pathogenese

Die Kamelpocken zeigen einen Verlauf, wie er für zyklische Infektionskrankheiten typisch ist. Untersuchungen über die Vermehrung des Virus in den einzelnen Organen liegen zwar nicht vor, Inkubationszeit, klinische Erscheinungen und Immunologie weisen jedoch so eindeutige Parallelen zu anderen zyklisch ablaufenden Pockeninfektionen auf, daß an einer pathogenetischen Ereigniskette bei Erstinfektionen mit Eintritt des Virus per Respirationstrakt, Vermehrung des Virus in primär affinen Organen und schließlich Generalisation mit typischer Organmanifestation kein Zweifel bestehen kann.

2.1.6. Immunologie

Die Krankheit hinterläßt eine gute Immunität. LEESE (29) nimmt an, daß die Morbidität bei älteren Tieren so gering ist, weil sie als Jungtiere eine Infektion überstanden und eine Immunität erworben haben. Nach BORISCVICH und OREKHOV (7) sind die Tiere nach überstandener Krankheit 20 - 25 Jahre lang, Fohlen von Kamelstuten mit überstandener Krankheit 3 Jahre lang immun.

Eine passive Immunisierung oder eine Serumtherapie mit Schafpocken-Hyperimmunserum schützt bzw. hilft nicht gegen Kamelpocken (7).

2.1.7. Klinik

Die Inkubationszeit der Kamelpocken beträgt beim erwachsenen Kamel 6 - 7 Tage. Neugeborene Fohlen nicht immuner Kamelstuten erkranken zwischen dem 3. und 5. Lebenstag (7).

Klinisch beginnen sich wenige Tage nach dem Auftreten der Prodromalsymptome Pusteln zu bilden, die bei mildem Verlauf auf Lippen, Nase, Augenlider sowie Mund- und Nasenschleimhäute beschränkt sind. In schweren Fällen mit fieberhaften Allgemeinerscheinungen breiten sich die Pusteln über den ganzen Körper aus. Häufig entsteht ein Hautödem am Kopf und an den Extremitäten. Tiere, die der Infektion nicht erliegen, gesunden nach 1 - 2 Monaten. Bei tragenden Kamelstuten kommt es meist zum Abort.

Sekundärinfektionen führen zu Eiteransammlungen unter den Pockenkrusten, zu Abszeßbildungen in Subkutis, Muskulatur, Lymphknoten und Lunge und zu allgemeinen pyämischen Erscheinungen. Derart erkrankte Tiere zeigen Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit, Diarrhoe und rasche Abmagerung. Entweder gehen solche Tiere rasch ein, oder sie erliegen erst nach mehreren Monaten einer vollständigen Erschöpfung (7, 12). Im allgemeinen erkranken Jungtiere schwerer als erwachsene Tiere. Die Morbidität in verseuchten Herden beträgt bei Jungtieren 25 - 100 %, bei älteren Tieren 5 - 25 % (11).

2.1.8. Bekämpfung

Verschiedene kamelhaltende Volksstämme praktizieren eine präventive Infektion (Variolation). Sie sammeln die eingetrockneten Krusten kranker Tiere und bewahren sie bis zum folgenden Jahr auf. Vor Ausbruch der feuchtwarmen Jahreszeit verreiben sie sie in Milch und inokulieren mit dieser virushaltigen Milch die Lippen einiger Tiere. Der Rest der Herde infiziert sich dann auf natürlichem Wege (64).

2.2. Erreger von Pockenerkrankungen bei Wieder- käuern

2.2.1. Gliederung und Virusarten

Die Pocken des Menschen und der Tiere werden hervorgerufen durch Virusarten, die in struktureller und funktioneller Hinsicht die höchste Organisationsform unter den echten Viren zeigen und sich dadurch von allen anderen Virusarten unterscheiden. Sie sind in der Familie Poxviridae eingeordnet (siehe Tabelle 1)(45).

Die Familie umfaßt 6 Genera und 4 selbständige Species. Strukturell und morphologisch weichen nur die Viren des Genus Parapoxvirus von den sonst einheitlichen, als echte Pockenviren bezeichneten übrigen Erregern ab.

Die Kameliden sind wiederkauende Schwielensohler. Im Zusammenhang mit den bei ihnen auftretenden Pocken interessieren daher in erster Linie Pockenvirusarten, die bei Wiederkäuern Erkrankungen hervorrufen. Dies sind aus dem Genus Orthopoxvirus zunächst das Vacciniavirus, ferner das Kuhpocken- und das Büffelpockenvirus. Speziell nur bei Wiederkäuern kommen vor die Species des Genus Ungulopoxvirus und des Genus Parapoxvirus mit Ausnahme des Parapoxvirus otariae (15, 22, 51, 64).

2.2.2. Eigenschaften

Zur Charakterisierung und Differenzierung der Pockenviren werden neben den morphologischen und einigen physikalisch-chemischen hauptsächlich

Tabelle 1: Gliederung der Familie Poxviridae
(nach MAYR u. Mitarb. (45))

Genus	Species	Deutscher Name
Orthopoxvirus	Op. commune Op. variolae Op. alastrim Op. bovis Op. muris Op. cuniculi Op. simiae Op. bubali Op. equi	Vacciniavirus, Impfpockenv. Variolavirus Alastrimvirus Kuhpockenvirus Mäusepockenv., Ektromeliev. Kaninchenpockenvirus Affenpockenvirus Büffelpockenvirus Pferdepockenvirus (evt. Variante von Op. commune)
Avipoxvirus	Ap. gallinae Ap. columbae Ap. meleagris Ap. serinae Ap. coturnicis Ap. agapornis (evt. 3 weitere Species bei Sperling, Star und Junco)	Hühnerpockenvirus Taubenpockenvirus Putenpockenvirus Kanarienvpockenvirus Wachtelpockenvirus Agapornidenpockenvirus
Ungulopoxvirus	Up. ovis Up. caprae Up. nodularis	Schafpockenvirus Ziegenpockenvirus Lumpy skin disease-Virus (Neethling-Typ)
Lepopoxvirus	Lp. myxomatosis Lp. fibromatosis Lp. leporis Lp. sciuris	Myxomvirus Fibromvirus Hasenfibromvirus Eichhörnchenfibromvirus
Entomopoxvirus	Ep. melolontha Ep. amsacta morsei Ep. chironomi (sowie 11 weitere Species bzw. Stämme)	Polypoxvirus chironomi
Parapoxvirus	Pp. ovis Pp. bovis 1 Pp. bovis 2 Pp. otariae	Orfvirus, Ecthymavirus, Pustulardermatitis-Virus Stomatitis papulosa-Virus Paravaccinia-, Euterpocken-, Melkerknotenvirus Seelöwenpockenvirus
Selbständige Species	Poxvirus suis P. molluscae P. simiae 2 P. tarae	origin. Schweinepockenv. Molluscum contagiosum-V. Yaba Affentumor-Virus Tanapockenvirus

biologische Eigenschaften herangezogen. Im wesentlichen sind es folgende Merkmale:

1. Größe und Achsenverhältnis des Virion
2. Struktur des Oberflächenproteins des Virion
3. Stabilität gegen Äther
4. Hämagglutininbildung
5. Einschlußkörperchenbildung
6. Spektrum, Vermehrungsintensität und Cytopathologie in Zellkulturen
7. Haftung und Pathogenese im Hühnerembryo
8. Züchtung und Pathogenese in kleinen und großen Versuchstieren
9. Serologische und immunologische Beziehungen

Von den Orthopoxviren kommt ~~dem~~ zur menschlichen Pockenschutzimpfung verwendeten Vacciniavirus (Op. commune) besondere Bedeutung zu. Es hat das breiteste Wirtsspektrum und kann praktisch bei allen Säugetieren, selbst bei Vögeln, Pockenerkrankungen hervorrufen (22, 46). Vacciniavirus-Infektionen entstehen meist über eine Verschleppung des Virus durch schutzgeimpfte Menschen. Die Vacciniavirus-bedingten Tierpocken sind im allgemeinen harmlos, meist lokale Infektionen, die keine Tendenz für eine seuchenartige Verbreitung zeigen.

Die Züchtung des Vacciniavirus gelingt leicht in den verschiedensten Wirten und Zellarten (19, 20, 46). Auch das bebrütete Hühnerei ist sehr geeignet (20, 27, 67). Die dabei auftretende gute und rasche Vermehrung sowie spezifische Veränderungen werden zur Differenzierung des Vacciniavirus herangezogen.

Eine Zusammenstellung der wichtigen Differenzierungsmerkmale zwischen dem Vacciniavirus (Cp. commune) und dem originären Kuhpockenvirus (Cp. bovis) hat MAYR (43) veröffentlicht. Das Vacciniavirus bildet am 3. Tag auf der Chorioallantoismembran (CAM) des bebrüteten Hühnereis 3 - 4 mm große, flache Herde mit ausgeprägten Nekrosen im Zentrum; am 4. Tag kommt es zur Generalisierung. Es haftet auch gut am Entoderm der CAM nach Allantoishöhlenbeimpfung. Die durch das Kuhpockenvirus erzeugten Herde treten etwa zur gleichen Zeit auf und erreichen auch die gleiche Größe; sie sind aber hämorrhagisch und mehr proliferativer Art. Beim Vacciniavirus wie auch beim Kuhpockenvirus gibt es jedoch Stämme, deren CAM-Herde jeweils denen der anderen Art gleichen oder stark ähneln (19). Bei Impfung in die Allantoishöhle des Brutels haftet das **Kuhpockenvirus** schlecht.

Nach kutaner Impfung der enthaarten Kaninchenhaut ruft das Vacciniavirus zwischen dem 3. und 6. Tag die Bildung von 2 - 3 mm breiten Pusteln mit zentraler Nekrose hervor. Selten folgt eine Generalisierung über den Gesamtorganismus. Bei Kuhpockeninfektion zeigen die entstehenden Pocken einen ausgesprochen hämorrhagischen Charakter, und es kommt hier in der Regel zu einer Generalisierung. Werden Hühner nach der Follikelmethode kutan mit Vacciniavirus infiziert, so entwickeln sich an der Inokulationsstelle Primärpocken. Impfungen mit Kuhpockenvirus verlaufen dagegen stets negativ. Die infantile Maus ist für das Vaccinia- wie auch

Kuhpockenvirus bei intracerebraler und intraperitonealer Infektion annähernd hoch empfänglich wie das Hühnerbrutei und die Zellkultur.

Das Büffelpockenvirus (Op. bubali) verhält sich insgesamt sehr ähnlich wie das Vacciniavirus. Auf der CAM entstehen bis 2 mm große Herde, die entweder weiß und proliferativ oder grau und flach sein können und nicht oder nur wenig hämorrhagisch werden. Zur Generalisierung kommt es selten. Auf der Kaninchenhaut aber entwickeln sich nach intrakutaner Infektion erythematöse Läsionen, die nur 7 mm groß werden (also nur etwa halb so groß wie die durch Vacciniavirus hervorgerufenen), und zwar auch nur dann, wenn man entweder kaninchenadaptiertes Virus oder aber eiadaptiertes Virus mit einem hundertfach höheren Virusgehalt als beim entsprechenden Vacciniavirus heranzieht (5). Wie die anderen Orthopoxviren bildet es ein Hämagglutinin, das Hühnererythrozyten agglutiniert (5, 8, 9, 20, 52).

Allen Orthopoxviren gemeinsam ist außerdem das Auftreten von plasmatischen Einschlusskörperchen als Folge der Virusvermehrung in den infizierten Zellen (19). Bei der Vermehrung in Einschichtzellkulturen rufen sie einen cytopathischen Effekt (cpE) hervor. Sie gelten als ätherstabil (2, 20, 23, 57), und ihre Widerstandsfähigkeit gegen Wärme ist relativ gut (19, 24). Von 16 untersuchten Vacciniastämmen erlitten 15 nach 40 Minuten Inkubation im Wasserbad von 55°C einen Titerabfall zwischen 0,8 und 2,5 Zehnerpotenzen; der Stamm Lederle 7 N allerdings verlor 4,6 Zehnerpotenzen (19). Bei Kuhpocken

betrug der Titerabfall 1,2 bis 2,0 Zehnerpotenzen (19), Büffelpockenviren sollen nur wenig wärmeempfindlicher als Kuhpockenviren sein (5). Kälte stabilisiert die Pockenviren sehr gut (20).

Bei Größenangaben über die Pockenviren des Genus Orthopoxvirus werden vielfach die Abmessungen des Vacciniavirus stellvertretend angeführt. Sie liegen bei etwa 350 - 360 mal 260 nm (46). Das Vacciniavirus gehört jedoch zu den größten Orthopoxviren. Das Variolavirus z.B. mißt nur 260 mal 180 nm (4), das Ektromelievirus etwa 230 mal 170 nm (41).

In das Genus Ungulopoxvirus sind drei Pockenvirusarten eingeordnet, die beim Schaf, bei der Ziege und beim Rind charakteristische, generalisierende Pockenerkrankungen mit typischem Exanthem erzeugen: das Schafpockenvirus (Up. ovis), das Ziegenpockenvirus (Up. caprae) und das Lumpy skin disease-Virus, Typ Neethling (Up. nodularis). Die drei Erreger besitzen morphologisch und strukturell die gleichen Eigenschaften wie alle echten Pockenviren. Für Up. nodularis wird die Größe mit 350 mal 300 nm angegeben (50). Sie besitzen jedoch keine hämagglutinierenden Eigenschaften. Gegen Chloroform und Äther verhalten sie sich labil, durch Hitze, Säuren und Laugen sind sie leicht zu inaktivieren (6, 50, 55, 57). Sie vermehren sich nicht in kleinen Versuchstieren, doch lassen sie sich in bestimmten Zellkulturen aus Rinder- und Schafgewebe mit cytopathischem Effekt züchten, nicht aber in Kulturen aus Hühnerembryofibroblasten (50, 73).

Im bebrüteten Hühnerei gelingt die Züchtung nur unter folgenden Bedingungen: Beimpfung auf die gesenkte CAM von 5 - 7 tägigen Bruteltern und Bebrütung bei 33,5 - 35°C. Dabei wird die stärkste Virusvermehrung 4 - 6 Tage p.inf. erreicht, aber erst zwischen dem 6. und 10. Tag entwickeln sich sichtbare Veränderungen als punkt- bis stecknadelkopfgroße Proliferationsknötchen in der gesenkten CAM-Fläche; beim Lumpy skin disease-Virus (LSD-Virus) sind sie oft in Reihen angeordnet. Es gibt keine sichtbare Generalisierung, und die Embryonen sterben nicht ab (50).

Die Parapockenviren, die ebenfalls speziell Wiederkäuer infizieren, unterscheiden sich von allen anderen Pockenviren zunächst bezüglich Größe, Form und Achsenverhältnis des Virion. Sie sind mit 226 mal 140 nm kleiner als die echten Pockenviren. Das Achsenverhältnis beträgt 1,6 gegenüber 1,3 des Vacciniavirus. Vor allem auch morphologisch bestehen grundsätzliche Unterschiede. Die Anordnung der oberflächlichen Proteinfilamente ist regelmäßig, so daß nach Negativfärbung ein elektronenmikroskopisches Bild entsteht, das an ein Schnurpaket erinnert (53, 54, 56). Die Parapocken sind gegen Chloroform und Äther empfindlich, gegen Wärmeeinwirkung aber relativ stabil (33, 35, 58). Nach PLOWRIGHT und FERRIS (57) soll jedoch die Ätherempfindlichkeit nicht größer sein als beim Vacciniavirus. Sie besitzen kein Hämagglutinin. Auch kleine Versuchstiere und das Hühnerbrutei sind nicht empfänglich (33, 58). Dagegen lassen

sie sich in Zellkulturen züchten. Geeignet sind für *Pp. ovis* Kulturen aus embryonaler Schafhaut, aus Hoden von Lamm und Kalb, aus embryonalen Nieren von Schaf, Ziege und Kalb, außerdem aus menschlichen Amnion-, Embryonieren- und Embryoleberzellen (58, 66). Dabei bilden sich große cytoplasmatische Einschlusskörperchen. *Pp. bovis* 1 und *Pp. bovis* 2 lassen sich in primären Rinder-
nieren-, Rinderhoden-, Rinderlungen-, Schaf-
nieren-, Schafhoden- und Affennierenkulturen züchten, ferner in Schilddrüsenkulturen und in menschlichen Amnionzellen. Die hier gefundenen Einschlusskörperchen unterscheiden sich nicht von denen, die man in Zellen findet, welche mit *Pp. ovis* infiziert sind (33, 34, 35).

ROSIYAKOV (65) beschrieb jüngst als Erreger einer pockenähnlichen Erkrankung des Kamels ein Virus, das er Dermovirus cameli benennt und das aufgrund seiner Morphologie ebenfalls ein Parapockenvirus sein dürfte.

2.2.3. Immunologische und serologische Beziehungen

Zwischen den Genera der Familie Poxviridae existieren keine gegenseitigen immunologischen Beziehungen. Serologisch sind lediglich bestimmte gemeinsame Antigene nachweisbar (67, 72).

Unter allen Species von Orthopoxvirus gibt es eine deutliche bis vollständige immunologische und serologische Verwandtschaft, das heißt, jede Infektion mit einer dieser Species schützt gegenüber einer Reinfektion mit einer anderen (3, 14,

16, 17, 25, 37, 47, 49).

Zwischen den Species von Ungulopoxvirus bestehen nur unvollständige immunologische Beziehungen. Schafe lassen sich mit LSD-Virus gegen Schafpocken und Rinder mit Schafpockenvirus gegen Lumpy skin disease immunisieren. Die Ziege kann weder mit Schafpockenvirus noch mit LSD-Virus gegen Ziegenpocken immunisiert werden, jedoch das Schaf mit Ziegenpockenvirus gegen Schafpocken. Serologisch ist die gegenseitige Verwandtschaft enger. Trotzdem wird das Ziegenpockenvirus am besten durch homologes Immunserum neutralisiert (50).

Die Parapoxviren bilden serologisch eine einheitliche Gruppe (32). Dabei ist noch nicht geklärt, ob es sich nicht bei der Dermatitis pustulosa, der Stomatitis papulosa und den Euterpocken um verschiedene Krankheitsformen, ausgelöst durch den gleichen Erreger, handelt. Nur in serologischen Untersuchungen mit Hilfe der partiellen Komplementbindungsreaktion ließen sich zwischen Stomatitis papulosa- und Dermatitis pustulosa-Viren gewisse serologische Unterschiede erfassen (68).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Virusstämme

Alle Untersuchungen wurden an dem von RAMYAR und HESSAMI (62) isolierten Kamelpockenvirus (KPV) durchgeführt. Der Stamm erhielt die Bezeichnung CP-1. Das als 3. Kulturpassage in Lammnierenkulturen vorliegende Material wurde über 5 Endpunktpassagen in Hühnerembryofibroblastenkulturen klonisiert und schließlich in BHK 21-Zellen vermehrt. Die Ernte wurde nach Aufschließen der Zellen durch Ultraschall bei 2 000 Umdrehungen pro Minute (UpM) 15 Minuten abzentrifugiert, anschließend das Virus in der Ultrazentrifuge (Spinco L 4) sedimentiert und in 0,02 molarem Trispuffer resuspendiert. Abgefüllt in Mengen zu 2 ml wurde diese Stammsuspension bis zur Weiterverwendung bei -70°C gelagert.

Als Vergleichsviren dienten folgende Pockenvirusstämme:

Vacciniavirus (Op. commune), Stamm Elstree (WHO-Referenzstamm), vorliegend als Kulturvirus der 2. Passage aus Hühnerembryofibroblastenkulturen (FHE-Kulturen),
Kuhpockenvirus (Op. bovis), Stamm KR-58, vorliegend als Kulturvirus der 2. Passage von eiadaptiertem Material in FHE-Kulturen,
Affenpockenvirus (Op. simiae), Stamm Copen-

hagen, vorliegend als Kulturvirus der 1. Passage von adaptiertem Material in FHE-Kulturen, Ektronelievirus (Op. muris), Stamm München, vorliegend als Kulturvirus der 3. Passage in FHE-Kulturen.

3.1.2. Zellkulturen und Kulturmedien

Zur Vermehrung des KPV und zur Titrierung wurde die Zelllinie BHK 21 (clone 13) verwendet. Als Anzuchtmedium diente eine modifizierte Hanks-Lösung (69) mit 10 % Kälberserum. Erhaltungsmedium war Leibowitz-Medium (31). Herangezogen wurde ferner die Zelllinie NBL (embryonale Pferdehautzellen), deren Anzuchtmedium aus Earle'scher Lösung mit Zusätzen von 10 % Kälberserum, je 1 % Vitamine, Aminosäuren und Glutamin (Difco) bestand. Das Erhaltungsmedium enthielt bei gleicher Zusammensetzung nur 2 % Kälberserum.

Daneben wurden Primärkulturen aus embryonalen Hühnerfibroblasten (FHE) benutzt, wobei als Anzuchtmedium Earle'sche Lösung mit 10 % Kälberserum und 10 % einer 5 %igen Laktalbuminlösung diente. Erhaltungsmedium war reine Rinderamnionflüssigkeit. Der Ansatz der Kulturen erfolgte nach MAYR und KALCHER (44).

Allen Kulturmedien wurde ferner Phenolrot und Antibiotika in den üblichen Mengen zugesetzt.

Das Agar-Überschichtungsmedium wird im Abschnitt 3.1.5. Plaqueteste beschrieben.

3.1.3. Züchtung im Hühnerbrutei

11 Tage vorbebrütete Eier aus seuchenfreien Beständen wurden auf die gesenkte Chorioallantois-membran (CAM) und in die Allantoishöhle beimpft. Die Absenkung der CAM erfolgte per Impffeder (48, 71). Die Beimpfung in die Allantoishöhle wurde nach dem üblichen Verfahren vorgenommen (70).

3.1.4. Virustitrationen

Die Titerbestimmungen wurden in Röhrenkulturen von NBL-, FHE- oder BHK-Zellen sowie in Hühnerbruteiern durchgeführt. Von Verdünnungsreihen in Zehnerpotenzen der Virusproben wurden pro Verdünnungsstufe 4 Kulturrohre bzw. Bruteier mit je 0,1 ml beimpft. Als Verdünnungsmittel diente phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)(18). Die Endablesung anhand des cytopathischen Effektes (cpE) erfolgte bei NBL- am 6., bei FHE- am 7., bei BHK-Kulturen am 3. Tag p.inf.. Bruteier wurden am 4. Tag geerntet und die Primärherdbildung auf der CAM ausgewertet.

Der Virustiter in Zellkulturen wurde nach KÄRBER (26) in KID_{50} (50 % kulturinfektiöse Dosis) pro ml ermittelt. Bei der Auswertung von Titrierungen im Brutei wurde neben der EID_{50} teilweise auch die Anzahl der pockenbildenden Einheiten (PBE) pro ml errechnet (71).

3.1.5. Plaqueteste

Bei den Plaqueversuchen (36, 61) und für die Plaquereduktionsteste (13, 49, 59) kam die von

MAYR und KALCHER (44) beschriebene Methode zur Anwendung.

Die in Petrischälchen von 4 cm Durchmesser gezüchteten PHE-Kulturen wurden vor der Beimpfung mit 37°C warmer PBS (3 ml pro Schälchen) gewaschen, dann mit je 0,1 ml der entsprechenden Virusverdünnung beimpft (bei Neutralisationstesten mit 0,2 ml des Virus-Serum-Gemisches) und zur Adsorption des Virus 2 Stunden bei 37°C im mit 5 % CO₂ begastem Brutschrank gelagert. Anschließend wurde der Zellrasen wieder mit 37°C warmer PBS gewaschen und mit 2 ml eines 42°C warmen festen Agar-Überschichtungsmediums versehen, bestehend aus 1 Teil 2 %igem Agar in Aqua dest. und 1 Teil doppelter Eagle-Earle'scher Lösung mit 20 % Kälberserum, 2 % Phenolrot und der doppelten üblichen Menge Antibiotika. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten, war nach 2 Tagen die Überlagerung mit flüssigem Überschichtungsmedium notwendig, das nach weiteren 3 Tagen erneuert werden mußte. Es bestand aus 1,1 %igem Medium 199, dem pro 100 ml Medium 4,4 ml NaHCO₃ (2,8 %ig), 12,5 ml Tryptosephosphatbouillon, 5 ml Kälberserum und die übliche Antibiotikamenge zugesetzt waren (28). Die Bebrütung dieser Schälchenkulturen erfolgte von der Anzüchtung bis zur Färbung ständig im Begasungsbrutschrank mit einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre.

Zur Färbung der Kulturen wurde das flüssige Überschichtungsmedium abgenommen und durch Farblösung (Neutralrot 1:5 000) ersetzt. Nach weiteren 2 Stunden im Begasungsbrutschrank konnte abgelesen werden.

3.1.6. Prüfung des Kamelpockenvirus auf Züchtbarkeit und Cytopathogenität in verschiedenen Zellarten

Hierfür wurde eine Reihe verfügbarer Zellarten (in Vierkantflaschen) herangezogen. Die Infektion erfolgte mit je 10^5 KID₅₀ direkt in das Erhaltungsmedium der Kultur. Nach dem Auftreten cytopathischer Veränderungen wurde die Kultur jeweils am Höhepunkt der Kulturzerstörung geerntet. Zellgebundenes Virus wurde durch einmalige klimatische Beugung und Aufschließen der Zellbestandteile mit Ultraschall freigesetzt. Nach dem Abzentrifugieren bei 2 000 UpM, 10 Minuten, wurden die Virusernten titriert.

3.1.7. Untersuchung auf Einschlusskörperchen

Hühnerembryofibroblastenzellen wurden in Leighton-Tubes angezüchtet, mit Erhaltungsmedium versehen und mit 0,1 ml einer Virussuspension ($10^{5,5}$ KID₅₀ /ml) beimpft. Einige Kulturen blieben unbeimpft als Kontrollen. An jedem der 6 folgenden Tage wurden 4 beimpfte Deckglaskulturen sowie 2 Kontrollen aus den Leighton-Tubes entnommen, in Bouin'scher Lösung 30 Minuten fixiert und mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt. Die lichtoptische Untersuchung erfolgte nach der Einbettung der Präparate in Kanadabalsam.

3.1.8. Äther-Resistenztest

Kulturvirus suspensionen wurden mit 10 %, 20 % und 30 % (Volumenprozent) Diäthyläther beschickt, Kontrollen nur mit 30 % physiologischer Kochsalzlösung versehen. Die Gemische wurden 1 Stunde lang bei 4°C geschüttelt und anschließend 30 Minuten bei 2 500 UpM abzentrifugiert. Der Äther wurde abgezogen. Mit einer langen Kanüle erfolgte anschließend aus der unteren Phase der Virus-suspension die Probeentnahme für die Titration.

3.1.9. Antiseren

Zur Herstellung eines Kamelpockenvirus-Antiserums dienten Kaninchen, deren Serum frei von Antikörpern gegen Orthopoxvirus war.

2 Tiere bekamen je 10 ml der Virussuspension intraperitoneal (i.p.) verabreicht, nach 3 Wochen wurden sie mit je 2 ml intravenös (i.v.) geboostert. Nach weiteren 10 Tagen wurden die Kaninchen entblutet und die Seren gewonnen.

Als Vergleichsseren dienten Kaninchen-Immunseren gegen Vaccinia-, Kuhpocken-, Affenpocken- und Ektromelievirus.

Bei allen Seren wurden die entsprechenden virusneutralisierenden Antikörpertiter gegen das homologe, immunisierende Virus im Neutralisationstest (Plaque- bzw. Herdreduktionstest), beim Vaccinia- und Kamelpocken-Immunserum auch die hämagglutinationshemmenden Antikörpertiter im Hämagglutinationshemmungstest ermittelt.

3.1.10. Hämagglutinationsteste (HA-Teste)

Sie wurden mit Kulturvirussuspensionen wie auch mit adaptiertem Virus der 1. CAM-Passage nach der von MAYR für die Pockenviren modifizierten Salk'schen Technik durchgeführt (42). Kontrollen mit Normalantigenen nicht infizierter Kulturen liefen parallel, ebenso Erythrozyten-Kochsalzlösung-Kontrollen.

Die Antigene wurden mit physiologischer Kochsalzlösung in Zweierpotenzen verdünnt, beginnend bei 1:4. Das Volumen betrug jeweils 0,3 ml. Jeder Antigenverdünnung wurden 0,3 ml 0,5 %ige Hühnererythrozytensuspension zugegeben. Nach gutem Durchschütteln blieben die Röhrchen bei Zimmertemperatur bis zur Auswertung 45 - 60 Minuten stehen. Als positive Reaktionen wurden nur solche gewertet, bei denen eine totale Agglutination im Sinne einer ++++ Reaktion vorlag. Als 1 hämagglutinierende Antigeneinheit wurde die letzte positive Antigenverdünnung bezeichnet.

3.1.11. Hämagglutinationshemmungsteste (HAH-Teste)

Gearbeitet wurde mit der Technik nach HIRST, modifiziert von SALK (42).

Die zu untersuchenden Seren wurden zuerst im Wasserbad bei 56°C 30 Minuten lang inaktiviert, anschließend mit physiologischer Kochsalzlösung in Potenzen von 2, beginnend bei 1:4, verdünnt (Volumen 0,3 ml) und schließlich pro Verdünnungsstufe 0,3 ml einer auf 4 hämagglutinierende Einheiten eingestellten Antigenverdünnung zugefügt. Nach

einer Reaktionszeit von 10 Minuten wurden in jedes Röhrchen 0,3 ml 0,5 %ige Hühnerythrocyten-suspension einpipettiert und durch Schütteln mit dem Inhalt vermischt. Nach 45 - 60 Minuten Sedimentationszeit bei Zimmertemperatur konnte ausgewertet werden. Als positive Hemmung galten die Reaktionen, bei denen das in der Kuppe der Röhrchen knopfförmig angeordnete Blutkörperchen-sediment zungenförmig auslief.

3.1.12. Neutralisationsteste

Es wurde die Serumverdünnungsmethode angewandt. Die in Zweierpotenzen angelegten Serumverdünnungsstufen inkubierten mit jeweils etwa 100 PBE (pockenbildende Einheiten auf der CAM) bzw. etwa 100 PBE (plaquebildende Einheiten in der Zellkultur) (63). Ausgewertet wurde anhand der Pocken- bzw. der Plaquereduktion. Als Neutralisationstiter (ND_{50}) eines Serums gilt dabei die Serumverdünnung, welche die Anzahl der Pockenherde bzw. der Plaques im Vergleich zur Normalserumkontrolle um 50 % reduziert (13, 49). In Kreuzneutralisationstesten wurden von jedem Serum 4 neutralisierende Einheiten (vierfache ND_{50}), ausgetestet gegen das homologe Virus, als Standardverdünnung eingesetzt.

Die auf ca. 100 PBE pro 0,1 ml eingestellten Virussuspensionen wurden 60 Minuten lang im Wasserbad bei 37°C mit der jeweils gleichen Menge Serumverdünnung (30 Minuten inaktiviert bei 56°C) inkubiert. 0,2 ml dieser Gemische wurden pro Plaqueschälchen bzw. CAM verimpft. Parallel liefen Virus- und Normalserumkontrollen.

3.1.13. Tierversuche

Kaninchen

Kaninchen der Rasse Weiße Wiener im Alter von etwa 10 Wochen und einem Gewicht von durchschnittlich 1,5 kg wurden mit einem Depilatorium auf einer ca. 10 x 10 cm großen Fläche am Rücken enthaart. In den linken Anteil dieser Fläche wurden intrakutan an zwei verschiedenen Stellen 0,1 ml Virussuspension injiziert, so daß deutlich sichtbare Quaddeln entstanden. Auf der rechten Teilfläche erfolgte auf einem 3 x 3 cm großen Feld die kutane Skarifikationsimpfung (Methode CALMETTE-GUÉRIN, 1901, modifiziert nach HERZBERG, 1955).

Eintagsküken

Männliche Hybrid-Eintagsküken wurden per Federfollikelmethode infiziert (43).

Infantile Maus

4 - 5 Tage alte Babymäuse wurden intracerebral (Volumen 0,05 ml) oder intraperitoneal (0,1 ml) infiziert.

Schaf

Ein 6 Wochen altes männliches Lamm (Deutsches Merino Landschaf) wurde an der linken Schulter auf einer 15 x 10 cm großen Fläche rasiert. Auf der oberen Hälfte der Fläche wurden intrakutan 3 Quaddeln mit je 0,5 ml Infektionsmaterial gesetzt, in der unteren erfolgte auf einem 3 x 6 cm großen Feld eine kutane Impfung per Skarifikationsgitter (siehe oben Kaninchen).

3.1.14. Elektronenmikroskopie

Kulturvirusernten aus der 1. Passage in BHK 21-Zellkulturen (Virustiter $10^{6,5}$ KID₅₀ /ml) wurden über eine fraktionierte Ultrazentrifugierung - wechselweise Zentrifugation bei 2 500 UpM über 15 Minuten und 20 000 UpM über 2 Stunden - etwa hundertfach konzentriert und das Sediment der dritten Ultrazentrifugierung in Aqua bidest. aufgenommen. Nach der Kontrastierung dieser konzentrierten Viruscharge mit 2 %iger Phosphorwolframsäure bei pH 6,8 wurde anschließend in einem Elektronenmikroskop Marke Siemens Elmiskop I untersucht.

3.2. Versuche und Ergebnisse

3.2.1. Morphologie

Im Elektronenmikroskop dargestelltes, negativ kontrastiertes Kamelpockenvirus zeigte eine Oberflächenstruktur, wie sie für die sogenannten echten Pockenviren typisch ist (vgl. Abbildung 1). Morphologische Unterschiede zu dem als Prototyp der echten Pockenviren geltenden Vacciniavirus konnten nicht festgestellt werden. Durchschnittlich lagen die Größenabmessungen der KPV-Partikel bei 260 - 280 nm (lange Achse) mal 190 - 200 nm (kurze Achse). Das Achsenverhältnis von 1,3 stimmt mit dem Verhältnis der echten Pockenviren überein.

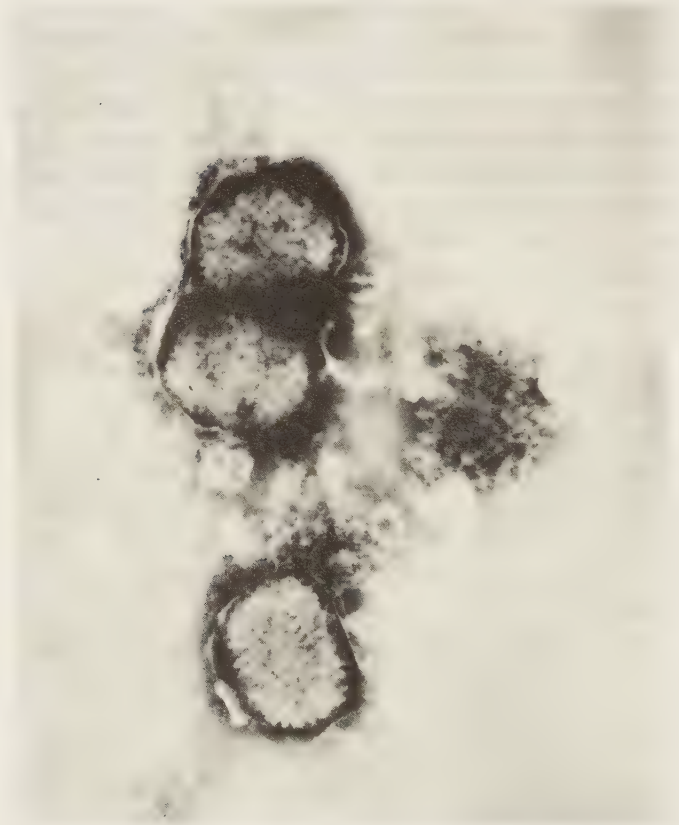
3.2.2. Züchtung im Hühnerbrutei

Kulturvirus der 1. NBL-Passage wurde in Zehnerpotenzen verdünnt und pro Verdünnungsstufe 20 Bruteiern mit je 0,1 ml auf die gesenkte CAM verimpft. Nach 2, 3, 4, 5 und 6 Tagen wurden von jeder Verdünnungsstufe 4 Eier entnommen und ausgewertet.

20 Bruteier wurden in die Allantoishöhle mit je $10^{5,25}$ MID₅₀ beimpft und nach dem gleichen Plan ausgewertet.

Auf der gesenkten CAM ließ sich das KPV mühelos anzüchten. Es bilden sich Pockenherde aus, von denen sich das Virus ernten und im Brutei auf der CAM weiterpassieren läßt.

Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von
Kamelpocken-Kulturvirus; Negativ-
Färbung mit Phosphorwolframsäure;
Gesamtvergrößerung 85 000-fach



3.2.2.1. Morphologie der CAM-Veränderungen

Die vom KPV auf der CAM hervorgerufenen Herde entwickelten sich nur auf dem primär beimpften CAM-Bezirk und erreichten eine Größe von maximal 0,6 mm. Meist waren sie rund, d.h. je nach Größe punktförmig bis halbkugelig (Erhabenheit des Herdes über die Oberfläche). Manchmal erschienen sie auch stippchenförmig oder polymorph-länglich. Sie setzten sich von dem verschieden stark getrübbten umgebenden Gewebe gut ab. Im allgemeinen waren die Einzelherde diffus über den beimpften CAM-Bezirk verstreut (Abb. 2), bisweilen reihten sie sich aber perlschnurartig aneinander. Dabei waren die Abstände häufig so gering, daß der Eindruck eines Strichs entstand (Abb. 3). Die Aneinanderreihungen waren unabhängig vom Blutgefäßverlauf.

3.2.2.2. Pathogenese

Außer einer ödematösen Verdickung im Bereich der gesenkten CAM (nach massiver Beimpfung) waren neben der Primärherdbildung makroskopisch keine weiteren Veränderungen erkennbar. Es kam weder zur Bildung von Sekundärherden noch zum Tod des Embryos, wenn bis zu 10^5 infektiösen Viruseinheiten pro Ei verimpft wurden.

3.2.2.3. Herdentwicklung und Vermehrungsintensität

Am 2. Tag p.inf. waren die Herde erstmals als sehr kleine (0,2 mm) und punktförmige Proife-rationen zu erkennen. Bis zum 4. Tag nahmen sie

Abb. 2: Einzelherde des Kamelpockenvirus (1. NBL-Passage) auf der CAM am 4. Tag p.inf.
Vergrößerung 2-fach

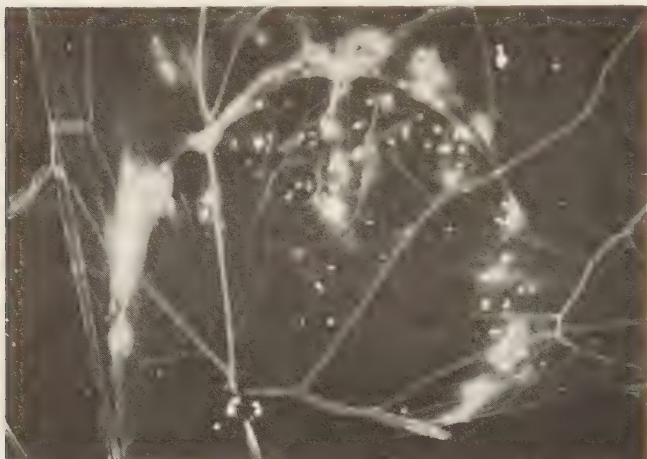
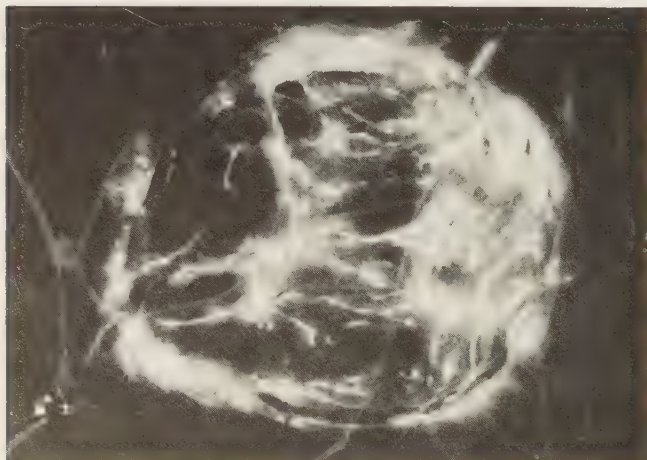


Abb. 3: Strichförmige Anordnung der von KPV (1. NBL-Passage) auf der CAM hervorgerufenen Herde am 4. Tag p.inf.
Vergrößerung 2-fach



bis auf 0,6 mm an Größe zu. Danach war keine weitere Vergrößerung feststellbar.

Je 10 Einzelpocken wurden vom 2. - 6. Tag p.inf. täglich geerntet und der Virusgehalt ermittelt. Er war in den Einzelherden relativ gering. Pro Gramm verändertes CAM-Gewebe konnte vom 2. - 6. Tag ein Gesamtvirusgehalt von 10^4 - 10^5 EID₅₀ berechnet werden.

3.2.2.4. Haftung am Entoderm

Nach der Beimpfung in die Allantoishöhle vermehrte sich das KPV am Entoderm der CAM nicht mit sichtbaren Veränderungen. Lediglich in unmittelbarer Umgebung der Inokulationsstelle in der CAM bildeten sich die Pockenherde auf dem Ektoderm der CAM.

3.2.3. Züchtung in Zellkulturen

3.2.3.1. Zellspektrum des Kamelpockenvirus

Das Spektrum der Zellarten, in denen sich das KPV vermehrte und dabei auch cytopathische Effekte erzeugte, war relativ breit. Die Intensität der Vermehrung war jedoch in den meisten Zellkulturen nur mäßig, und die Ausbildung der cytopathischen Effekte dauerte relativ lang. Relativ gut vermehrte sich das Kamelpockenvirus in BHK 21-, NBL-, PK 15-, Lammnieren- und MS-Kulturen, weniger gut in FHE-, SK- und Ma 111-Kulturen, schlecht in MDBL-, EKN- und Vero-Kulturen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Zellspektrum des Kamelpockenvirus

Zellart	Cytopathischer Effekt	Virus- ernte, (Tag)	Titer (-log 10 KID ₅₀ /ml)
BHK 21 (Hamsternieren)	zu Beginn Abkugelungen (3. Tag), danach rasche Lysis (4. Tag)	4.	6,5
PK 15 (Schweinenieren)	2. Tag Granulierung, dann Abkugelung und Zerstörung (4. Tag)	4.	5,5
Vero (Affennieren)	am 8. Tag noch kein cpE	3.	1,0
SK (Schweinenieren)	ab 2. Tag Abkugelungen, danach rasche Lysis	3.	3,75
MS (Affennieren)	lytischer, mäßig rascher cpE ab 2. Tag, daneben große Syncytien mit großblasiger Vakuolenbildung	3.	5,0
Ma 111 (Kaninchennier.)	langsame Lysis ab 5. Tag, bis zum 9. Tag dauernd	8.	3,0
MDBK (Rindernieren)	langsame Lysis ab 5. Tag	8.	1,25
NBL (Pferdehaut)	am 5. Tag Abkugelungen, dann rasche Lysis (6. Tag)	6.	6,25
EKN (embryon. Kälbernieren)	am 8. Tag kein cpE	8.	1,25
LN (prim. Lammnieren)	rascher lytischer cpE (3. Tag)	3.	5,25
FHE (Hühnerembr. Fibroblasten)	lytischer cpE ab 5. Tag	4.	4,0

3.2.3.2. Vermehrungsintensität

Der Ablauf der Virusvermehrung wurde an 2 für das KPV relativ gut empfänglichen Zellkulturarten untersucht.

Röhrchenkulturen mit PK 15- und BHK 21-Zellen wurden nach der Entfernung des Anzuchtmediums mit je 0,5 ml Virussuspension, enthaltend 10^5 MID₅₀, beschickt. Nach einer Adsorptionszeit von 2 Stunden wurden die Kulturen dreimal mit je 5 ml angewärmter PBS gewaschen und dann mit je 2 ml Erhaltungsmedium versehen. Nach 2, 6, 10, 16, 24, 30, 40, 50 und 60 Stunden wurden jeweils 4 Röhrchen jeder Zellart entnommen. Zur Bestimmung des zellfreien Virus wurde das Medium abgenommen, zentrifugiert (2 000 UpM, 10 Minuten) und bei -20°C bis zur Titration aufbewahrt, für das zellgebundene Virus wurde der im Röhrchen verbliebene Zellrasen einmal mit 5 ml PBS gewaschen, dann mit 2 ml Erhaltungsmedium versehen und das Röhrchen bei -20°C bis zur Titration eingefroren. Unmittelbar vor der Titration wurden nach dem Auftauen die Zellen im Medium mit Ultraschall aufgeschlossen, die Proben abzentrifugiert (2 000 UpM, 10 Minuten) und jeweils die 4 Röhrchen einer Probe gemischt.

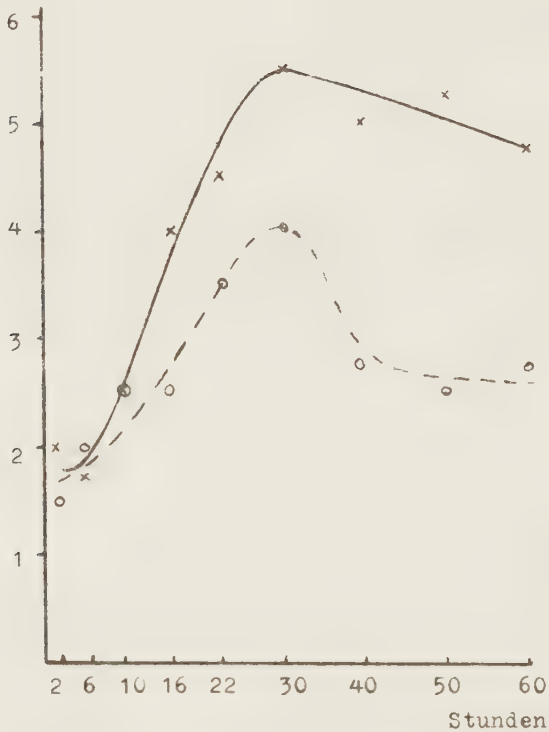
Die Ergebnisse der Untersuchungen mit KPV an PK 15- und BHK 21-Zellen lassen sich in Form einer Vermehrungskurve darstellen (Abb. 4). Die Mengen an freiem und zellgebundenem Virus sind in Abhängigkeit von der Zeit ausgedrückt.

Aus der Kurve in Abbildung 4a geht hervor, daß in PK 15-Zellen ca. 30 Stunden nach der Beimpfung der höchste Virusgehalt erreicht wurde. Dies gilt sowohl für zellgebundenes Virus als auch für freies Virus im Medium. Der cytopathische Effekt trat demgegenüber verzögert ein. Er begann am 2. Tag und erreichte seinen Höhepunkt etwa am 4. Tag.

Die Abbildung 4b zeigt, daß in BHK 21-Kulturen der Virusgehalt nach etwa 50 - 60 Stunden seinen

Abb. 4a: Ablauf der Virusvermehrung beim
KPV in PK15-Zellkulturen

Virustiter
($-\log 10$)
KID₅₀/ml



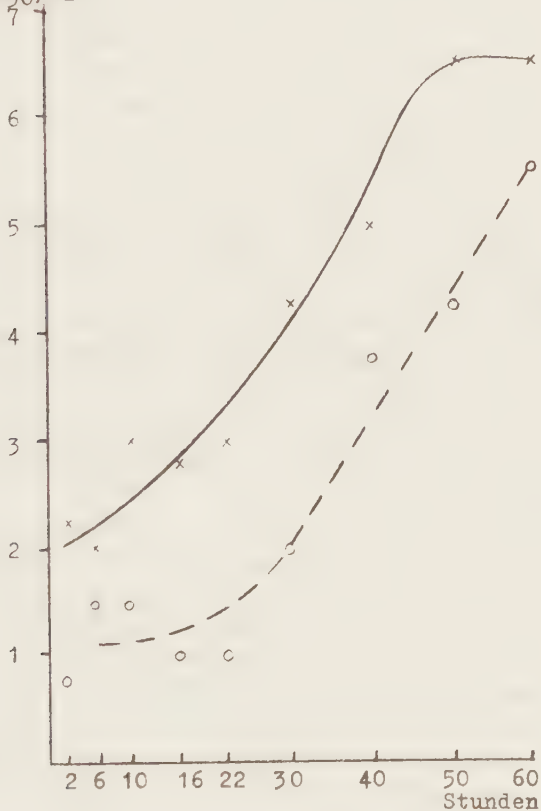
Das Zeichen x gibt den Titer des zellgebundenen Virus an,
das Zeichen o den Titer des freien Virus.

Abb. 4b: Ablauf der Virusvermehrung beim
KPV in BHK 21-Zellkulturen

Virustiter

($-\log_{10}$)

KID₅₀/ml



Das Zeichen x gibt den Titer des zellgebundenen Virus an,
das Zeichen o den Titer des freien Virus.

höchsten Wert erreichte, etwa 1 Tag später als in PK 15-Kulturen. Die Virusausbeute am Höhepunkt der Vermehrung lag um etwa 1 Zehnerpotenz höher als in PK 15-Zellen.

In beiden Zellsystemen war der zellgebundene Virusanteil während des Untersuchungszeitraums von 60 Stunden nach der Beimpfung stets um mehr als 1 Zehnerpotenz höher als im Kulturmedium.

3.2.3.3. Plaquebildung

Für die Untersuchung der Plaquebildung beim Kampfpockenvirus wurden FHE-Zellkulturen in Petrischälchen verwendet. Vom 2. bis 10. Tag nach der Infektion der Schälchenkulturen, die mit so niedrigen Virusdosen vorgenommen wurde, daß einzelne Plaques entstanden, wurden je 4 Schälchen täglich entnommen und gefärbt. Eine Binokularlupe mit 12- bis 50-facher Vergrößerung diente als Hilfe bei der Durchmusterung der Kulturen.

Am 3. Tag fand man erstmals punktförmige, mikroskopisch erkennbare Veränderungen, charakterisiert als runde Zonen stark gefärbter Zellen, die von der Umgebung klar abgegrenzt waren. Diese Herde veränderter Zellen breiteten sich in den folgenden Tagen zentrifugal aus. Der Rand erschien dabei deutlich als stark gefärbte schmale Zone aus granulierten, kugeligen und sich stark anfärbenden Zellen, während die Färbbarkeit der Zellen im Zentrum des Herdes dann wieder abnahm und alle Übergänge von farblos bis zur Farbe der Normalkultur aufweisen konnte. Die Plaques erreichten bis zum 7. Tag eine Größe von nur etwa 1 mm. Sie waren makroskopisch als nicht gefärbte kleine Löcher im Zellrasen nur

dann zu erkennen, wenn die Zellen im Zentrum abgestorben waren und sich nicht mehr anfärbten. Dies war jedoch nicht immer der Fall.

Bis zum 10. Tag nahmen die Plaques nicht mehr an Größe zu. Auch die Zahl der makroskopisch erkennbaren Plaques erhöhte sich nicht.

3.2.3.4. Einschlußkörperchen

Ab dem 3. Tag nach der Beimpfung fanden sich in den Kulturzellen intraplasmatische Einschlußkörperchen. Sie waren eosinophil. In vielen Zellen waren zunächst 2 bis 3 beisammenliegende kleine Einschlüsse zu sehen, während vom 5. Tag p.inf. an überwiegend nur ein relativ großes Einschlußkörperchen mit einem großen hellen Hof dicht am Kern zu finden war. Die Form der Einschlüsse war meist rund, gelegentlich aber auch nierenförmig bis unregelmäßig. In Zellkernen wurden keine Einschlußkörperchen gefunden.

3.2.4. Züchtung im Tier

3.2.4.1. Kaninchen

6 Kaninchen wurden mit Kamelpocken-Kulturvirus, das auf einen Virusgehalt von 10^5 KID₅₀ pro 0,1 ml eingestellt worden war, infiziert, 2 davon kutan per Skarifikation, 2 intrakutan mit je 0,1 ml pro Impfquaddel und 2 intraperitoneal mit je 5 ml. Die Tiere wurden dann 2 Wochen lang täglich kontrolliert.

Bei allen Tieren konnte weder eine lokale Reaktion an den Impfstellen noch Anzeichen einer Erkrankung festgestellt werden.

3.2.4.2. Eintagsküken

20 Eintagsküken wurden mittels Federfollikel-methode kutan mit Kamelpocken-Kulturvirus (Virus-gehalt $10^{5,5}$ KID₅₀ /0,1 ml) infiziert.

Alle Tiere entwickelten innerhalb von 3 Wochen keinerlei follikuläre Reaktion.

3.2.4.3. Infantile Maus

Um die Empfänglichkeit der infantilen Maus für das Kamelpockenvirus zu ermitteln, wurde eine Kultur-virussuspension mit einem Virusgehalt von $10^{5,5}$ KID₅₀ /0,1 ml parallel zur Zellkultur auf Babymäusen titriert, wobei pro Verdünnungsstufe bei intracerebraler Inokulation 0,05 ml je Tier und bei intraperitonealer Infektion 0,1 ml pro Tier verabreicht wurden. Bei jeder Titration wurden pro Verdünnungsstufe 8 Babymäuse eingesetzt. 2 Würfe mit zusammen 33 Babymäusen dienten als Kontrollen.

Aus der intracerebralen Titration wurde anhand der Absterbequote der Babymäuse eine LD₅₀ von $2 \times 10^{1,8}$ pro 0,1 ml errechnet. Die Tiere verendeten zwischen dem 6. und 10. Tag p.inf.. Aus dem Vergleich mit der Titration in BEK-Zellkulturen kann errechnet werden, daß für die intracerebrale Infektion bei Babymäusen etwa 10^4 KID₅₀ notwendig sind, um eine Babymaus zu töten, also 10^4 KID₅₀ einer LD₅₀ für Babymäuse entsprechen.

Die intraperitoneale Titrierung von KPV-Kultur-virus an Babymäusen ergab eine LD₅₀ von $10^{0,6}$. Demnach entsprechen etwa 10^5 KID₅₀ einer LD₅₀ für die Babymaus bei intraperitonealer Infektion.

Von den 33 Kontrollmäusen starben nur 3 während 18 Tagen Beobachtungszeit unspezifisch.

3.2.4.4. Schaf

Die kutan und intrakutan mit Kamelpocken-Kulturvirus infizierten Schafe ließen über 3 Wochen Beobachtungszeit keinerlei Reaktionen an den Inokulationsstellen erkennen. Der Virusgehalt des Infektionsmaterials betrug $10^{5,5}$ KID₅₀ / 0,1 ml.

Ein parallel dazu kutan mit Vacciniavirus infiziertes Schaf, für das eine Kulturvirussuspension mit gleichem Virusgehalt verwendet wurde, zeigte eine typische Impfreaktion mit Pustelbildung.

3.2.5. Hämagglutinin

In der Hämagglutinationsreaktion mit Hühnererythrozyten reagierte das Kamelpockenvirus sowohl als Kulturvirus wie auch als eiadaptiertes Virus positiv hämagglutinierend. Kulturvirus mit einem Titer von $10^{6,5}$ EID₅₀ pro ml hämagglutinierte bis zur Verdünnung 1:16 vollständig (++++). Das Kontrollantigen aus Normalkulturen reagierte negativ. Eine Suspension aus eiadaptiertem Kamelpockenvirus, die einen Virustiter im Ei von ebenfalls $10^{6,5}$ EID₅₀ pro ml besaß, hämagglutinierte gleichfalls bis zur Verdünnung 1:16 (++++). Die Kontrolle mit Ei-Normalantigen zeigte in der Verdünnung 1:4 eine schwache Reaktion (+).

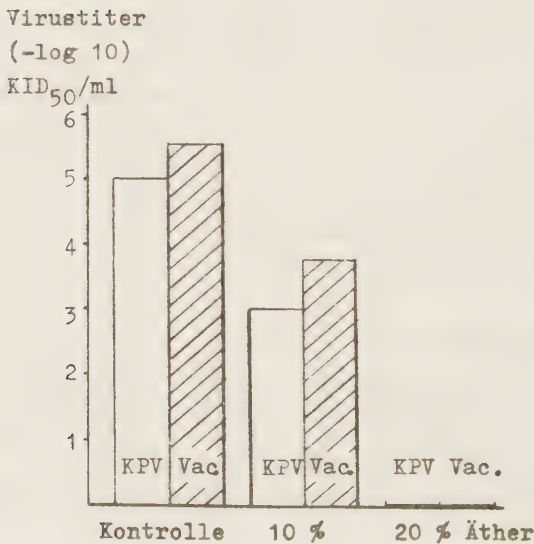
3.2.6. Ätherstabilität

Die Behandlung von Kamelpocken-Kulturvirus (Titer 10^5 EID₅₀ / ml) mit 10 % Äther führte gegenüber der Kontrolle zu einem Titerabfall um 2 Zehnerpotenzen, was einer Inaktivierung von 99 %

der infektiösen Einheiten entspricht. Nach der Behandlung mit 20 % und 30 % Äther war kein infektiöses KPV mehr nachweisbar. Die Ergebnisse der Prüfungen des KPV auf sein Verhalten gegenüber Diäthyläther sind in der Abb. 5 dargestellt.

Parallel wurde der analoge Versuch mit Vacciniavirus angesetzt (Vgl. Abb. 5). Nach der Behandlung mit 10 % Äther kam es zu einem ähnlich starken Titerabfall um 1,75 Zehnerpotenzen. Nach der Behandlung mit 20 % und 30 % Äther war, wie beim KPV, kein infektiöses Vacciniavirus mehr nachweisbar.

Abb. 5: Vergleichende schematische Darstellung der Ätherempfindlichkeit beim Kamelpockenvirus und beim Vacciniavirus



3.2.7. Serologische Beziehungen des Kamelpocken- virus zu den Orthopoxviren

3.2.7.1. Kreuzteste in der Hämagglutinations- hemmungsreaktion

Immunseren gegen Kamelpocken-, Vaccinia-, Kuhpocken-, Affenpocken- und Ektromelievirus wurden auf ihre Hämagglutinationshemmende Wirkung gegen je 2 HA-Einheiten eiadaptiertes Kamelpockenvirus und zum Vergleich gegen eiadaptiertes Vacciniavirus untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: HAH-Antikörpertiter von KPV- und 4 Orthopoxvirus-Immunseren gegen KPV- und Vacciniaantigen

Serum	KPV-Antigen	Vacc.-Antigen
Kamelpockenserum	1:16	1:32
Vacciniaserum	1:32	1:64
Kuhpockenserum	1:64	1:64
Affenpockenserum	1:64	1:256
Ektromelieserum	1:64	1:64

Alle verwendeten Immunseren hemmten die Hämagglutination sowohl des Kamelpocken- als auch des Vacciniavirus. Auffallend war zunächst, daß das

Kamelpockenserum gegenüber den Vacciniaantigen eine etwas bessere Hemmwirkung zeigte als gegen das homologe Kamelpockenantigen. Das Vacciniaserum dagegen hemmte das Kamelpockenantigen etwas schlechter als das homologe Antigen. Kuhpocken- und Ektromelieserum hemmten gegen beide Antigene gleich stark, das Affenpockenserum wirkte jedoch gegen Kamelpockenvirusantigen 4-fach schwächer als gegen Vacciniaantigen.

3.2.7.2. Kreuzversuche im Neutralisationstest

Die Untersuchungen über die Wechselbeziehungen im Neutralisationstest zwischen Kamelpocken-Kulturvirus und Orthopox-Immunseren einerseits und Kamelpocken-Immunserum und Orthopoxvirusarten andererseits wurden in sogenannten Pockenreduktionstesten durchgeführt.

Zum Nachweis der Neutralisation von Kamelpockenvirus durch verschiedene Immunseren wurde eiadaptiertes KPV verwendet und die Tests anhand der Pockenherdreduktion auf der CAM ausgewertet. Der Plaquereduktionstest in Hühnerembryofibroblastenkulturen erschien aufgrund der Unregelmäßigkeit der Plaquebildung beim Kamelpockenvirus nicht geeignet.

Die Neutralisation der 4 zum Vergleich herangezogenen Orthopoxvirusarten, Vaccinia-, Kuhpocken-, Ektromelie- und Affenpockenvirus durch Kamelpocken-Immunserum wurde in Plaquereduktionstesten an Hühnerembryofibroblasten-Schälchenkulturen durchgeführt. Da bei den letztgenannten Virusarten zeitliche Unterschiede in der Entwicklung der Plaques auftreten (10, 60, 61), mußte in Vorversuchen der optimale Zeitpunkt für die Plaqueauswertung dieser Virusarten in Hühnerembryofibro-

blastenkulturen bestimmt werden. Bei der angewandten Technik bildeten das Vacciniavirus und das Kuhpockenvirus am 4. Tag p.inf. Plaques von 1,5 bis 2 mm Größe, die zu diesem Zeitpunkt gut erkennbar und differenzierbar waren. Bei diesen 2 Virusarten wurden die Reduktionsteste deshalb am 4. Tag abgelesen. Die Plaqueentwicklung beim Ektromelievirus wurde erst am 6. Tag ausgewertet, als die Plaques bei einer Größe von 1 bis 1,5 mm gut erkennbar waren. Erst am 7. Tag p.inf. wurden die Plaques des Affenpockenvirus, die dann etwa eine Größe von 1 mm erreicht hatten, gezählt.

In einem orientierenden Vorversuch wurde zunächst geklärt, ob zwischen dem Kamelpockenvirus und dem Referenzvirus der Orthopoxviren, dem Vacciniavirus, überhaupt eine Neutralisation eintritt. Die Neutralisation wurde mit 60 - 80 PBE Kamelpockenvirus pro 0,1 ml gegen 1:4 verdünntes Vaccinia-Immunserum durchgeführt. Eine Kontroll-Neutralisation mit Normalserum lief parallel. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 dargestellt.

Das Vaccinia-Immunserum neutralisierte das KPV eindeutig. Die Herdreduktion gegenüber dem Normalserum betrug 85,5 %. Damit war zunächst nachgewiesen, daß deutliche Beziehungen in der Kreuzneutralisation zwischen KPV und den anderen Orthopoxviren zu erwarten waren.

Im Hauptversuch wurden die Neutralisationen von KPV (im Pockenherdreduktionstest im Ei) durch je 4 neutralisierende Einheiten von Vaccinia-, Kuhpocken-, Ektromelie- und Affenpocken-Immunseren durchgeführt, sowie die Neutralisationen von Vacciniavirus, Kuhpockenvirus, Ektromelie- und Affenpockenvirus (in Plaquerduktionstesten) durch 4 neutrali-

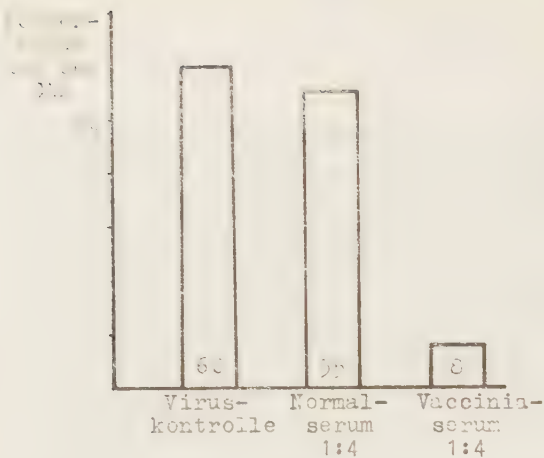


Abb. 6: Neutralisation von Kamelpeckenvirus durch Vaccinia - Immunsere (Versuch)

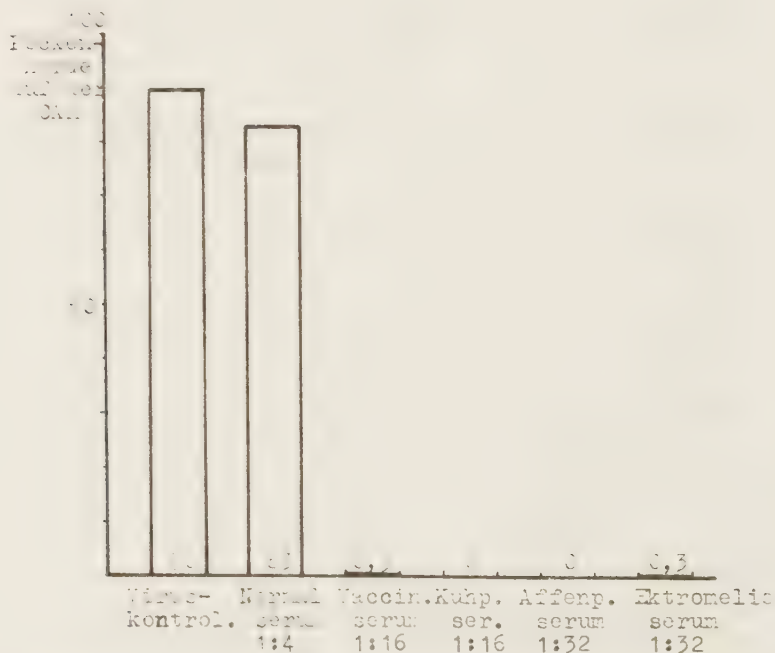
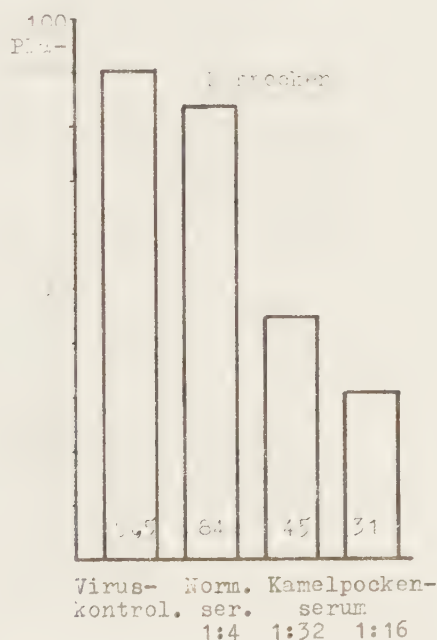
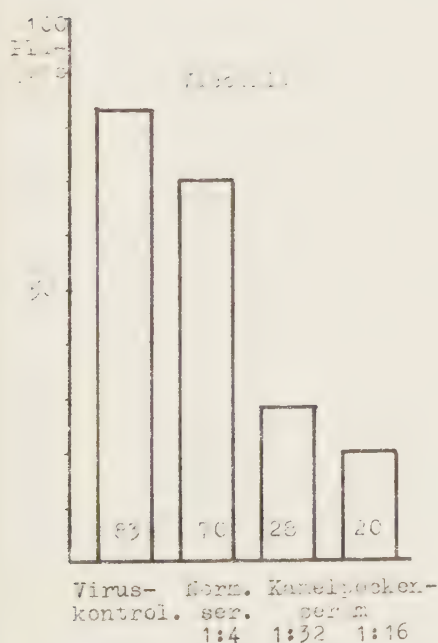
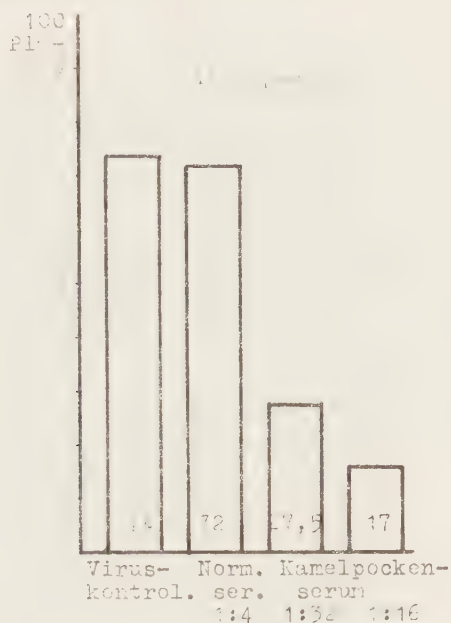


Abb.7: Neutralisation von Kamelpeckenvirus durch Immunseren (jeweils 4 ND₅₀) verschiedener Orthopoxviren

Abb. 31. Virusinaktivierung durch Kamelpocken - Immunsere
 (ca. 100 PFU)



sierende Einheiten Kamelpockenserum.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt.

KPV erwies sich gegen die heterologen Orthopox-Immunseren als empfindlicher (Herdreduktion fast 100 %) als die Orthopoxviren gegen Kamelpocken-Immunserum. Die Kamelpockenserumverdünnung 1:32, die den 4 neutralisierenden Einheiten entspricht, führte nur zu Plaquereduktionen zwischen 46 % und 62 %. Dabei waren das Affenpockenvirus und das Vacciniavirus mit 62 % bzw. 60 % Reduktion besser neutralisierbar als das Ektromelievirus mit einer Plaquereduktion um 47 % und das Kuhpockenvirus mit 46 %. Die letztgenannten 2 Pockenviren ließen sich jedoch mit je 8 neutralisierenden Kamelpockenserumeinheiten deutlicher und einwandfrei (über 50 % Reduktion) neutralisieren.

3.2.7.3. Kreuzschutztest im Kaninchen

Da für Infektionsversuche mit KPV kein geeignetes, empfängliches Versuchstier verfügbar war, wurde der Kreuzschutztest über die Immunisierung von Kaninchen mit KPV vorgenommen und die gebildete Immunität gegen Vacciniavirus geprüft, das beim Kaninchen gut erkennbare, typische Hautveränderungen hervorruft (43).

4 Kaninchen der Rasse Weiße Wiener, 10 Wochen alt und 1,5 kg schwer, wurden für diesen Versuch verwendet.

Kaninchen Nr. 1 und Nr. 2 wurden intraperitoneal $10^{7,5}$ KID₅₀ Kamelpockenvirus (enthalten in 10 ml Suspension) injiziert. Nach 3 Wochen erfolgte eine Boosterung mit $10^{6,8}$ KID₅₀ (intravenös) Kamelpocken-

virus. Kaninchen Nr. 3 wurde kutan per Schnittimpfung (4 Schnitte) mit Vacciniavirus geimpft. Kaninchen Nr. 4 wurde als Kontrolle nicht behandelt.

Alle 4 Kaninchen wurden 4 Wochen nach der Erstinfektion kutan mit Vacciniavirus (Titer 10^7 KID₅₀ pro ml) durch 4 Impfschnitte testinfiziert.

Bei dem Kontrollkaninchen (Nr. 4) war an der Impfstelle 3 Tage nach der Testinfektion eine leichte Ödematisierung und Rötung feststellbar. Schon einen Tag später bildeten sich Papeln. Daraus entwickelten sich bis zum 7. Tag 9 Pusteln mit zentraler Einschmelzung, die so eng aneinanderlagen, daß die sich anschließend bildenden dicken Borken geschlossen die gesamte Impfstelle bedeckten. Nach 21 Tagen wurde das Tier getötet. Es war sehr abgemagert, und die Impfstelle war noch immer mit Borken belegt. Der Verlauf der Testinfektion beim Kontrolltier entsprach einer positiven Erstimpfreaktion.

Die beiden mit Kamelpockenvirus immunisierten Kaninchen (Nr. 1 und 2) erkrankten nach der Testinfektion mit Vacciniavirus nicht; auch das mit Vacciniavirus immunisierte Tier (Nr. 3) zeigte keinerlei lokale Reaktion. Es entwickelte zwar am 3. Tag nach der Challengeinfektion eine einzelne leichte Rötung und Schwellung an der Impfstelle, die am nächsten Tag einer Papel mit hochrotem Zentrum ähnelte.

Nach rascher Verschorfung war diese Einzeleffloreszenz aber bis zum 7. Tag völlig abgeheilt. Sie dürfte bakteriell bedingt gewesen sein, da sie keinerlei Ähnlichkeit mit Pockenreaktionen erkennen ließ.

Die Versuchstiere wie auch die Vaccinia-Kontrolle waren deshalb als voll immun anzusprechen.

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die in bestimmten Gebieten Afrikas und Asiens epizootisch auftretenden Pocken der Kamele werden durch ein Virus hervorgerufen, das in die Familie der Poxviridae eingeordnet werden muß. RAMYAR und HESSAMI (62), die das Virus im Iran isolierten und bisher als einzige kürzlich beschrieben, konnten seine Zugehörigkeit zur Pockengruppe bereits sicherstellen.

Das Kamelpockenvirus gleicht morphologisch den echten Pockenviren und hat eine Größe von 270 nm (62). In eigenen Untersuchungen wurden diese Befunde bestätigt. Das Viruspartikel besitzt eine ausgeprägte quaderförmige Gestalt mit Abmessungen von 260 - 280 mal 190 - 200 nm bei einem Achsenverhältnis von 1,3. Es ist kein Parapockenvirus. Von diesem Genus unterscheidet es sich wie alle echten Pockenviren in der Struktur seines Oberflächenproteins, in seiner Größe und im Achsenverhältnis.

RAMYAR und HESSAMI (62) haben das Kamelpockenvirus zwar in Zellkulturen und in bebrüteten Hühnerei angezüchtet, eine nähere biologische Charakterisierung des Erregers nahmen sie jedoch nicht vor.

Die Identifizierung und Differenzierung der Pockenvirusarten untereinander ist aber nur aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften möglich. Die Eingliederung des KPV in das System der Pockenviren hing von diesen Kriterien ab. Im einzelnen ging es hauptsächlich darum, ob das KPV dem Genus Orthopoxvirus oder dem Genus Unkulopoxvirus zuzuordnen oder aber als selbständige Species anzusehen ist, und

inwieweit es sich speziell von Vacciniavirus, Kuhpockenvirus, Büffelpockenvirus und Schafpockenvirus abgrenzen läßt.

Das KPV vermehrt sich in der CAM des bebrüteten Hühnereis und bildet dabei sehr kleine, proliferative Veränderungen. Aus der CAM läßt sich das Virus zurückgewinnen und ohne Schwierigkeiten unter Ausbildung der gleichen Veränderungen weiterpassieren. Der Virusgehalt der kleinen Kamelpockenherde ist dabei naturgemäß im Vergleich zu anderen Pockenvirusarten, die sich unter Ausbildung größerer Primärveränderungen im Ei vermehren, niedrig. Eine Generalisierung über den Hühnerembryo sowie ein Absterben des Bruteis erfolgt nicht, das Virus haftet auch nicht am Entoderm der CAM.

Anhand seiner charakteristischen Vermehrung im Hühnerbrutei läßt sich das KPV bereits als eigenständige Pockenvirusart von allen anderen Pockenvirusarten abgrenzen. Die Species des Genus Ungulopoxvirus, unter ihnen das Schafpockenvirus zum Beispiel, haften nur schwer auf der CAM, bilden nur abortive Veränderungen und lassen sich nicht weiterpassieren. Zu den vergleichbaren Species von Orthopoxvirus, wie Vaccinia-, Kuhpocken- und Büffelpockenvirus, bestehen eindeutige Unterschiede in der Herdmorphologie und in der Pathogenese (5, 43, 45). Allenfalls das Ektromelievirus, das jedoch nur für Mäuse pathogen ist, bildet vergleichbare Primärveränderungen. Auch das Variolavirus bzw. Alastrimvirus darf im Vergleich nicht außer Acht gelassen werden. Seine CAM-Herde sind zu vergleichbarer Zeit jedoch größer und wesentlich kompakter als die des Kamelpockenvirus (38). Daneben führt die Variolainfektion im Brutei in der

Regel zu einer mäßigen bis starken Generalisierung mit Absterben des Embryos. Eine Ähnlichkeit der Kamelpockenherde auf der CAM des Hühnerbruteis mit Vacciniaherden, wie sie RAMYAR und HESSAMI (62) feststellten, war nie zu beobachten.

Bezüglich seiner Vermehrung in Zellkulturen nimmt das Kamelpockenvirus eine Zwischenstellung ein. Das Spektrum der Zellarten, in denen es sich vermehrt und dabei auch cytopathische Effekte erzeugt, ist relativ breit. Vergleichbar ist es in diesen Eigenschaften nur mit den Orthopoxviren. Die Vermehrungsintensität in den meisten Zellkulturarten war aber nur mäßig, und die Ausbildung der cytopathischen Effekte dauerte länger. In Hühnerembryofibroblastenkulturen, in denen sich alle Arten von Orthopoxvirus mit cytopathischem Effekt vermehren, unterschied sich das KPV insbesondere in der Plaquebildung von den vergleichbaren Pockenviren. Die schwächere Vermehrungsintensität trat dabei deutlich hervor. Vergleichbare Ergebnisse über die Vermehrungsintensität des KPV in Zellkulturen und im Hühnerbrutei liegen bisher nicht vor. RAMYAR und HESSAMI (62) vermehrten das Virus in Lammnierenkulturen mit einer Virusausbeute von etwa $10^{6,5}$ KID₅₀ /ml bei einem vollständigen cpE. In einer Reihe anderer Zellarten beobachteten sie cytopathische Effekte, auch in Vero (Affennieren)-Kulturen. Eigene Versuche mit Vero-Zellen verliefen negativ. Dagegen wurde eine vergleichbar gute Vermehrung wie in Lammnierenkulturen in Hamsternieren- (BHK 21) und embryonalen Pferdehaut- (EBL) Zellen festgestellt. In den infizierten Kulturzellen ließen sich intraplasmatische, eosinophile Einschlußkörperchen in der für Ortho-

pockenviren typischen Form und Lage nachweisen. Dagegen wurden nie Kerneinschlüsse gefunden, wie sie RAMYAR und HESSAMI (62) in Lammnierenzellen beobachteten.

Die in den Versuchen an Zellkulturen und insbesondere im Hühnerbrutei heraustretende starke Art-spezifität des KPV in seinen biologischen Merkmalen bezüglich dieser Zellsysteme überraschte. Sie wurde in den Versuchen über das Wirtsspektrum des Virus noch deutlicher. Auch bei Anwendung hoher Virus-dosen haftete das KPV nicht am Kaninchen, Schaf und Küken. Selbst 5 Tage alte infantile Mäuse, in denen sich alle bisher bekannten Orthopoxviren mit Ausnahme des Variola- und Alastrimvirus sehr gut züchten lassen und eine relativ hohe letale Wirkung entfalten, erwiesen sich für das KPV bei intracerebraler und intraperitonealer Infektion nur sehr schwach empfänglich. Ein vergleichbar enges Wirtsspektrum besitzen unter den Orthopoxviren nur das Variolavirus und das Alastrimvirus. Infantile Mäuse zeigen für sie eine nur mäßige, dosis- und altersabhängige Empfänglichkeit (39).

Die Tierversuche stellten weitgehend sicher, daß das KPV weder mit einem bisher charakterisierten originären Pockenvirus der Wiederkäuer noch mit einem der Orthopoxviren artgleich sein konnte. Ähnlichkeiten ließen sich lediglich zum Variolavirus bis zu einem gewissen Grade hinsichtlich des Verhaltens in der *Babymaus* feststellen.

In den weiteren Untersuchungen über die Äther-stabilität, die Hämagglutininbildung und die serologischen Beziehungen des KPV wurde nachgewiesen, daß es zu den Viren des Genus Orthopoxvirus einge-

ordnet werden kann. Die Orthopoxviren gelten wie die Avipoxviren als Ätherstabil (2, 20, 23, 57). In den eigenen vergleichenden Versuchen über die Ätherstabilität des KPV, bei denen die bisher beschriebene Technik exakt eingehalten wurde, trat jedoch selbst bei der Verwendung von nur 10 % Äther eine gewisse Labilität auf. Der dabei festgestellte Titerabfall nach der Ätherbehandlung von 2 Zehnerpotenzen trat jedoch auch bei dem vergleichend mituntersuchten Vacciniavirus, das als Referenzvirus der Orthopoxviren gilt, zu. Es kann somit nur ausgesagt werden, daß sich das KPV in seiner Ätherstabilität wie die Orthopoxviren verhält, demnach im Gegensatz zu den Angaben von RAMYAR und HESSAMI (62) als ätherstabil zu gelten hätte.

Hämagglutinierende Eigenschaften gegenüber Hühnererythrozyten, die ebenfalls alle Orthopoxviren besitzen (5, 8, 9, 20, 52), wurden sowohl bei Kamelpocken-Kulturvirus als auch -Eivirus nachgewiesen. Die hämagglutinierende Aktivität der Kamelpockenvirussuspensionen war jedoch geringer als die von Vacciniavirussuspensionen mit vergleichbarem Gehalt an infektiösem Virus.

In der Hämagglutinationshemmungsreaktion ließ sich eine eindeutige serologische Verwandtschaft zwischen dem KPV und den vergleichend mituntersuchten Vaccinia-, Kuhpocken-, Affenpocken- und Ektromelienviren feststellen. Die Immunseren aller 4 Vergleichsviren der Orthopoxgruppe hemmten die Hämagglutination des KPV. Das Vaccinia-Immunserum hemmte geringfügig, das Affenpocken-Immunserum deutlich schwächer als gegen Vacciniavirus-

Hämagglutinin. Das Kamelpockenserum dagegen hemmte Vacciniavirus etwas besser als das homologe Virus. Nach den Ergebnissen der HAH-Teste scheint die Beziehung des KPV zum Vacciniavirus enger zu sein als zu Kuhpocken- und Ektromelievirus. Die Relation zum Variolavirus konnte aus arbeitstechnischen Gründen leider nicht ermittelt und in den Vergleich einbezogen werden.

Eine eindeutige serologische Verwandtschaft zu den Orthopoxviren bewiesen auch die Kreuzversuche im Neutralisationstest. Dabei fiel auf, daß sich das KPV durch Immunseren von Vacciniavirus, Kuhpockenvirus, Affenpockenvirus und Ektromelievirus ausgezeichnet neutralisieren ließ. Umgekehrt jedoch hatte das Kamelpocken-Immunserum nur gegenüber dem Vaccinia- und Affenpockenvirus eine vergleichbar gute neutralisierende Wirkung, während es bei Verwendung von 4 neutralisierenden Serumeinheiten gegenüber dem Kuhpocken- und dem Ektromelievirus weniger als 50 % neutralisierte. Bei Verwendung von 8 neutralisierenden Serumeinheiten war hier die Wirkung aber ebenfalls eindeutig. Einseitig stärkere Beziehungen wurden auch zwischen anderen verwandten Pockenarten vielfach beobachtet. Daneben muß berücksichtigt werden, daß das im nicht empfänglichen Kaninchen hergestellte Kamelpockenserum grundsätzlich nicht die neutralisierende Kraft besitzen dürfte wie die Immunseren, die von erkrankten Tieren gewonnen wurden. Auf die inkompletten, nur relativen neutralisierenden Eigenschaften von Pockenserum, die zur Anwendung von Reduktionstesten zwingen, sei ebenfalls hingewiesen.

Unterschiedlich starke serologische Beziehungen hat man in Kreuzneutralisationen auch zwischen den anderen Orthopoxviren aufgezeigt. So ließen sich Kuhpocken- und Ektromelievirus deutlich voneinander differenzieren, ebenso klar aber auch konnten zwischen diesen beiden Viren und dem Vacciniavirus sowie auch zu dem von letzterem kaum unterscheidbaren Kuhpockenvirus serologische Abstände im Neutralisationstest nachgewiesen werden (3, 49). Auch das Büffelpockenvirus unterschied sich in Kreuzversuchen vom Kuhpockenvirus und signifikant vom Vacciniavirus (25).

Parallelen zum Grad der verwandtschaftlichen Beziehungen sollten aus solchen unterschiedlichen serologischen Kreuzreaktionen jedoch nicht gezogen werden, weil sich die Ergebnisse als zu sehr system- bzw. methodenabhängig erwiesen (3, 49) und weil erhebliche Differenzen selbst zwischen einzelnen Vacciniavirusstämmen auftreten können (3).

Der Schutz von KPV-immunisierten Kaninchen gegenüber Vacciniavirus kann nur als orientierende Aussage gewertet werden. Das positive Resultat harmoniert jedoch mit den Ergebnissen der Häm-agglutinationshemmungs- und Neutralisationsversuche, die bestätigten, daß zwischen dem KPV und den Orthopoxviren eine fundierte serologisch-immunologische Beziehung bestehen dürfte.

Die wichtigsten Unterschiede in einigen Eigenschaften zwischen Kamelpockenvirus und 5 weiteren Pockenviren sind in der Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4: Ätherstabilität und biologische Eigenschaften einiger vergleichbarer Pockenviren

	Kampfpockenvirus	Variolavirus	Vacciniavirus	Kuhpockenvirus	Güfpockenvirus	Schafpockenvirus
Ätherstabilität	+	+	+	+	n.b.	-
Kaninchen intrakutan	negativ	negativ	starke Reaktion mit nekrotischer Einscheidung, z.T. hämorrhagische Komponente	starke hämorrhagische Reaktion, Generalisierung	Leichte, akute erythematöse Reaktion	negativ
Küken follikulär	negativ	n.b.	positive, milde Follikelreaktion	negativ	n.b.	negativ
Baby Maus 1. per. 1. cer.	sehr wenig empfängl. sehr wenig empfängl.	mäßig empfänglich mäßig empfänglich	hoch empfänglich hoch empfänglich	hoch empfänglich hoch empfänglich	n.b. n.b.	negativ negativ
Schaf kutan	negativ	negativ	positiv, Pustelreaktion	n.b.	n.b.	positiv, Pustelreaktion, Generalisierung
Hühnerembryo (CAM)	punktförmige Herde, 0,6 cm Ø, keine Generalisierung	stecknadelkopfgroße, erhabene und prolifer. Herde, 1- 1,5 cm Ø, General.	nekrotische Herde, 3 bis 4 cm Ø, Generalisierung	hämorrhagisch-proliferative Herde, 2 bis 3 cm Ø, Generalisierung	flache, weißliche proliferative Herde, 2 cm Ø, selten Generalisierung	winzige, diffuse Effloreszenzen, nicht passierbar
Zellkulturen	mäßig breites Zellspektrum, Vermehrung gut bis schwach, cpE verzögert	relativ breites Zellspektrum, Vermehrung mäßig bis sehr gut, cpE gut	sehr breites Zellspektrum, Vermehrung und cpE sehr gut	Zellspektrum etwas enger, Vermehrung und cpE f.d.R. etw. schwach, als Vaccinia	n.b.	enges Zellspektrum, aber Vermehrung und cpE gut
Hämagglutination	+	+	+	+	+	-
Immunologische Beziehungen	zu allen Orthopoxviren	zu allen Orthopoxviren	zu allen Orthopoxviren	zu allen Orthopoxviren	zu allen Orthopoxviren	nur zu Gegenpockenviren und LSD-Virus, nicht zu Orthopoxviren

cpE = cytopathischer Effekt

LSD = Lumpy skin disease

n.b. = nicht bekannt

Eine zusammenfassende Wertung aller Untersuchungsergebnisse läßt den Schluß zu, daß das Kamelpockenvirus dem Genus Orthopoxvirus der Familie Poxviridae zuzuordnen ist. Da es sich jedoch in nahezu allen biologischen und artspezifischen Eigenschaften von denen der anderen Arten der Orthopoxviren zweifelsfrei abhebt und unterscheiden läßt, muß das Virus als eigene Species angesprochen werden. Aufgrund seines Verhaltens in Zellkulturen, im Hühnerbrutei und in Versuchstieren wurde deutlich, daß es zu den anderen Orthopoxviren einen größeren Abstand in genetischer Hinsicht besitzt als zum Beispiel Vaccinia-, Kuhpocken-, Büffelpocken-, Affenpocken- und Kaninchenpockenvirus gegenseitig aufweisen. Dieser größere Abstand deutete sich auch in den serologischen Beziehungen im Neutralisationstest an. Nicht geprüft werden konnte das Verhältnis zum Variolavirus. Parallelen hinsichtlich Wirtsspektrum und hoher Wirtsspezifität lassen an die Möglichkeit denken, daß das Kamelpockenvirus dem Variolavirus des Menschen besonders nahestehen könnte. Diese Frage wäre in besonderen, gezielten Versuchen anderen Orts zu klären.

Eine Beziehung zwischen Kamelpocken und Schafpocken, wie sie früher vermutet wurde (1), besteht nicht. Sie konnte auch von anderen Untersuchern nicht bestätigt werden (7, 62). Das KPV ist auch nicht mit dem Erreger der Kuhpocken, dem originären Kuhpockenvirus, oder dem Erreger der Pferdepocken, dem Vacciniavirus, identisch, wie MASON (40) annahm. Ob das Virus am Pferd haftet und Pocken erzeugt, was zum Teil bejaht (38), zum Teil verneint wurde (1), ließ sich in eigenen Versuchen nicht

überprüfen. Es erscheint jedoch möglich. FINDLEY (21) beschrieb gutartige Hauteruptionen bei Tierpflegern, die mit kamelpockenkranken Tieren Berührung hatten. Zumindest seiner Feststellung, daß sich die Tierpfleger anschließend als immun gegenüber den Pocken des Menschen erwiesen, muß aufgrund der jetzt vorliegenden Ergebnisse Glauben geschenkt werden.

Aus der Zugehörigkeit des Kamelpockenvirus zum Genus Orthopoxvirus und der guten serologischen Verwandtschaft kann die Hoffnung abgeleitet werden, daß eine Immunisierung gegen die Kamelpocken mit dem heterologen Vacciniavirus möglich ist. Eine solche Immunprophylaxe gegen die Kamelpocken käme aber nur in Frage, wenn sich eine gute immunologische Beziehung auch in Kreuzschutztesten am Kamel nachweisen läßt und sich eine Impfung mit dem Vacciniavirus für die Kamele als unschädlich erweist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Erreger der epizootisch auftretenden Pocken der Kamele ließ sich in Zellkulturen verschiedenen Ursprungs mit einem cytopathischen Effekt und unter Ausbildung cytoplasmatischer Einschußkörperchen züchten, er vermehrt sich auf der Chorioallantoismembran des Hühnerembryos mit spezifischen Veränderungen und besitzt hämagglutinierende Eigenschaften. Von den Versuchstieren ist nur die Babymaus in sehr geringem Maße für das Virus empfänglich.
2. Morphologisch gleicht das Kamelpockenvirus den echten Pockenviren.
3. In der Gesamtheit seiner biologischen Eigenschaften unterscheidet sich das Kamelpockenvirus von den bisher bekannten Pockenvirusarten und besitzt die Merkmale einer eigenen Virusspecies.
4. Das Kamelpockenvirus hat bestimmte biologische Eigenschaften, die nur die Pockenviren des Genus ORTHOPOXVIRUS charakterisieren, und eine starke serologische Verwandtschaft zu den Arten dieses Genus.
5. Die Einordnung des Kamelpockenvirus unter der binominalen Bezeichnung ORTHOPOXVIRUS CAMELI in das Genus ORTHOPOXVIRUS der Familie POXVIRIDAE erscheint gerechtfertigt.

SUMMARY

1. The agent associated with the epizootically appearing pox disease in camels could be grown in cell cultures of different origin. A cytopathic effect and formation of cytoplasmic inclusion bodies are observed in the cultures. Growth occurred also in the chorioallantoic membranes of embryonated hens' eggs and the agent shows hemagglutinating activity. Only babymice are susceptible to the virus of all laboratory animals tested.
2. Camel pox virus resembles the morphology of the true pox viruses.
3. As far as biological properties are concerned the camel pox virus is distinct from all the known pox viruses and shows characteristics of an own virus species.
4. Camel pox virus possesses certain biological properties which characterizes the genus ORTHOPOXVIRUS. It has a strong serological relationship with these viruses.
5. The classification of the camel pox virus as ORTHOPOXVIRUS CAMELI within the genus ORTHOPOXVIRUS and the family POXVIRIDAE is suggested.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Amanschulov, S.A.,
A.A. Samarzev und
L.N. Arbusov, 1931: Über die "Kull-Pocken", eine Art
Hauterkrankungen bei Kamelen im
Uralbezirk (Kasakstan)
Z. Infekt. Krankh. parasit. Krankh. Hyg.
Haustiere 38, 186
2. Andrews, C.H. and
D.M. Horstmann,
1949: The susceptibility of viruses to
ethyl ether
J. gen. Microbiol. 3, 290
3. Appleyard, G. and
J.C.N. Westwood,
1964: A protective antigen from the pox-
viruses: II. Immunization of animals
Brit. J. exp. Path. 45, 162
4. Avakyan, A.A. and
A.F. Bykovsky,
1964: The structure of intracellular
variola virus
Acta virol. 8, 481
5. Baxby, D. and
B.J. Hill, 1971: Characteristics of a new poxvirus
isolated from Indian buffaloes
Arch. ges. Virusforsch. 35, 70
6. Bennet, Horgan and
Haseeb, 1944: zit. nach Andrews, C.H. and D.M.
Horstmann (2)
7. Borisovich, Y.P.
and M.D. Orekhov,
1966: Camel pox
Veterinariya, Moscow 1966 No. 3, 50
zit. nach Vet. Bull., Weybridge 36, 4739

8. Chu, C.M., 1948: Studies on vaccinia haemagglutinin
I. Some physico-chemical properties
J.Hyg., Camb. 46, 42

9. Collier, W.A., 1951: Untersuchungen über Pockenhämagglutinine und Anti-Hämagglutinine
Zentbl. Bakt. Parasitkde Abt. I. Orig. 157, 119

10. Cooper, W.A., 1961: An improved agar cell-suspension plaque assay for poliovirus: Some factors affecting efficiency of plating
Virology 13, 153

11. Cross, H.E., 1917: The camel and its diseases
Baillière, Tindall and Cox, London
zit. nach Röhrer, H. (64)

12. Curasson, G., 1947: Le chameau et ses maladies
Vigot Frères, Paris
zit. nach Röhrer, H. (64)

13. Cutchins, E., J. Warren and W.P. Jones, 1960: The antibody response to smallpox vaccination as measured by tissue culture plaque method
J. Immun. 85, 275

14. Downie, A.W., 1939: The immunological relationship of the virus of spontaneous cowpox to vaccinia virus
Brit. J. exp. Path. 20, 158

15. Downie, A.W. and Pox viruses
K.R. Dumbell, 1956: A. Rev. Microbiol. 10, 237
16. Downie, A.W. and A study of the pox viruses by com-
A. MacDonald, plement fixation and inhibition of
1950: complement fixation methods
J. Path. Bact. 62, 389
17. Downie, A.W. and The viruses of variola, vaccinia,
K. McCarthy, cowpox and ectromelia - neutraliza-
1950: tion tests on the chorioallantois
with unabsorbed and absorbed
immune sera
Brit. J. exp. Path. 31, 789
18. Dulbecco, R. und zit. nach Plowright, W. und
M. Vogt, 1954: Mitarb. (58)
19. Fenner, F., The biological properties of several
1958: strains of vaccinia, cowpox and
rabbitpox viruses
Virology 5, 502
20. Fenner, F. and A short description of the poxvirus
F.M. Burnet, group (vaccinia and related viruses)
1957: Virology 4, 305
21. Findlay, 1936: zit. nach Röhrer, H. (64)
22. Herrlich, A., Die Pocken
1967: Georg Thieme Verlag, Stuttgart,
2. Auflage

23. Joklik, W.K., The poxviruses
1966: Bact.Rev. 30, 33
24. Kaplan, C., The heat inactivation of vaccinia
1958: virus
 J.gen.Microbiol. 18, 58
25. Kataria, R.S. and Serological relationship of buffalo-
I.P.Singh, pox virus to vaccinia and cowpox
1970: viruses
 Acta virol. 14, 307
26. Kärber, G., Beitrag zur kollektiven Behandlung
1931: pharmakologischer Reihenversuche
 Arch.exp.Path.Pharmakol. 162, 480
27. Keogh, E.V., Titration of vaccinia virus on chorio-
1936: allantoic membrane of chick embryo
 and its application to immunological
 studies of neuro-vaccinia
 J.Path.Bact. 43, 441
28. Kraft, V., Untersuchungen zur Differenzierung
1971: eines bei Zwergpapageien isolierten
 Pockenvirus
 Vet.Med.Diss., Berlin
29. Leese, A.S., 1909: zit. nach Ramyar, H. and Hessami (62)
30. Leese, A.S., 1927: zit. nach Röhrer, H. (64)
31. Leibowitz, A., A medium for the growth and maintenance
1963: of tissue cell cultures in free gas
 exchange with the atmosphere
 Am.J.Hyg. 78, 173

32. Liebermann, H., 1966: Serologische Beziehungen zwischen Paravacciniaviren
Arch.exp.VetMed. 20, 1353
33. Liebermann, H., 1967: Die verwandtschaftlichen Beziehungen der Stomatitis papulosa zu anderen Erkrankungen bei Mensch und Tier
Arch.exp.VetMed. 21, 1391
34. Liebermann, H., J.Nagington und P.Schulze, 1967: Vergleichende Untersuchungen an Stomatitis papulosa-, Euterpocken- und Melkerknotenvirusstämmen
Arch.exp.VetMed. 21, 625
35. Liebermann, H. und D.Urbaneck, 1966: Isolierung und Identifizierung von Stomatitis papulosa-Virus mit Hilfe der Zellkultur
Arch.exp.VetMed. 20, 1267
36. Lindenmann, J. and G.E.Gifford, 1963: Studies on vaccinia virus plaque formation and its inhibition by interferon.
I. Dynamics of plaque formation
Virology 19, 283
37. MacDonald, A. and A.W.Downie, 1950: Serological study of the soluble antigens of variola, vaccinia, cowpox, and ectromelia viruses
Brit.J.exp.Path. 31, 784
38. Mahnel, H. und A.Herrlich, 1961: Zur Züchtung des Variola- und Alastrim-virus im bebrüteten Hühnerei
Zentbl.Bakt.ParasitKde Abt.I Orig. 181, 137

39. Mahnel, H. und
E. Munz, 1965: Diplacentare und trophogene Über-
tragung der Variolaimmunität bei
der weißen Maus
Z. Hyg. Infekt. Krankh. 150, 340
40. Mason, 1840: zit. nach Röhrer (64)
41. Matsumoto, S.,
1958: Electron microscopic studies on the
proliferative modus of ectromelia
virus
Acta path. Jap. 8, 735
42. Mayr, A., 1956: Experimentelle Arbeiten über das
hämagglutinierende Prinzip bei
den Tierpockenviren
Arch. Virusforsch. 6, 439
43. Mayr, A., 1966: Eine einfache und schnelle Methode
zur Differenzierung zwischen
Vaccine- (poxv. officinale) und
Kuhpockenvirus (poxv. bovis)
Zentbl. Bakt. Parasit. Kde. Abt. I Orig.
199, 144
44. Mayr, A. und
K. Kalcher, 1961: Plaque-Bildung bei den Geflügel-
pockenviren
Arch. Virusforsch. 11, 307
45. Mayr, A., H. Mahnel
und E. Munz,
1972: Systematisierung und Differenzierung
der Pockenviren
Zentbl. VetMed. B 19, 69

46. Mayr, A. und
E. Munz, 1965: Die Pockenschutzimpfung (Das
Vacciniavirus)
in Herrlich, A. Handbuch der
Schutzimpfungen
Springer-Verlag Berlin, Heidel-
berg, New York
47. McCarthy, K. and
A. W. Downie,
1948: An investigation of immunological
relationship between the viruses of
variola, vaccinia, cowpox and ectro-
melia by neutralization test on the
chorioallantois of chick embryos
Brit. J. exp. Path. 29, 501
48. McCarthy, K. and
K. R. Dumbell,
1961: Chorioallantoic inoculation of eggs:
An improved method
Virology 14, 488
49. McNeill, T. A.,
1968: The neutralization of pox viruses
II. Relationships between vaccinia,
rabbitpox, cowpox and ectromelia
J. Hyg., Camb. 66, 549
50. Munz, E., 1966: Die Lumpy skin disease des Rindes
Vet. Med. Habilitationsschrift,
München
51. Munz, E., 1967: Die Rinderpocken in der Sicht moder-
ner virologischer Erkenntnisse
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 80, 202
52. Nagler, F. P. O.,
1942: zit. nach Chu, C. M. (8)

53. Nagington, J. and R.W.Horne, 1962: Morphological studies of orf and vaccinia viruses
Virology 16, 248
54. Nagington, J., W.Flowright and R.W.Horne, 1962: The morphology of bovine papular stomatitis virus
Virology 17, 361
55. Pandey, R. and I.P.Singh, 1970: A note on heat, chloroform and ether sensitivity of sheeppox and goat pox viruses
Acta virol. 14, 318
56. Peters, D., G.Müller and D.Büttner, 1964: The fine structure of paravaccinia viruses
Virology 23, 609
57. Flowright, W. and R.D.Ferris, 1959: Ether sensitivity of some mammalian pox viruses
Virology 7, 357
58. Flowright, W., M.A.Witcomb and R.D.Ferris, 1959: Studies with a strain of contagious pustular dermatitis virus in tissue culture
Arch.Virusforsch. 9, 214
59. Porterfield, J.S., 1960: A simple plaque inhibition test for the study of arthropod-borne viruses
Bull.Wld Hlth Org. 22, 373
60. Porterfield, J.S. and A.C.Allison, 1960: Studies with poxviruses by an improved plaque technique
Virology 10, 233

61. Postlethwaite, R., 1960: A plaque technique for the titration of vaccinia virus in chick embryo cells and some features of vaccinia infection in this system
Virology 10, 466
62. Ramyar, H. and M. Hessami, 1972: Isolation, cultivation and characterization of camel pox virus
Zentbl. VetMed. B 19, 182
63. Rolle, M. und A. Mayr, 1966: Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 3. Auflage
64. Röhrer, H., 1967: Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren Band 2
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
65. Roslyakov, A. A., 1972: Comparison of the ultrastructure of camel pox virus, the virus of a pox-like disease in camels, and contagious ecthyma virus
Voprsy Virusologii 17, 26
zit. nach Vet. Bull., Weybridge 42, 4545
66. Schmidt, D., 1967: Experimentelle Beiträge zur Kenntnis der Dermatitis pustulosa des Schafes IV. Die Züchtung des Virus der Dermatitis pustulosa in der Gewebekultur
Arch. exp. VetMed. 21, 701

67. Schmidt, D.,
1967: Experimentelle Beiträge zur Kenntnis der Dermatitis pustulosa des Schafes IX. Der Nachweis von Beziehungen des Virus der Dermatitis pustulosa zu anderen Viren der Pockengruppe mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion und des Agar-Gel-Tests
Arch.exp.VetMed. 21, 723
68. Schmidt, D. und
H. Liebermann, 1967: zit. nach Liebermann, H. (33)
69. Traub, E.,
G. K. Kanhai and
F. Kesting,
1968: Behaviour of foot-and-mouth disease virus on serial passage in different kinds of cells. A contribution to experimental epidemiology at cell level
Zentbl.VetMed. B 15, 525
70. Volckart, W.,
1966: Grundlagen und Methoden zur Züchtung von Viren in Vogelembryonen
Vet.Med.Diss., München
71. Westwood, J. C. N.,
P. H. Phipps and
E. A. Boulter,
1957: The titration of vaccinia virus on the chorioallantoic membrane of the developing chick embryo
J. Hyg., Camb. 55, 123
72. Woodroffe, G. M.
and F. Fenner,
1962: Serological relationships within the poxvirus group: An antigen common to all members of the group
Virology 16, 334
73. Zuber, M.,
1966: Züchtung von Schafpockenvirus in Zellkulturen
Vet.Med.Diss., München

Herrn Prof.Dr.Dr.h.c. A. Mayr
möchte ich herzlich für die Über-
lassung des Themas und für seine
freundliche Hilfe danken.

Für wertvolle Hinweise und hilf-
reiche Unterstützung gilt Herrn
Prof.Dr. H. Mahnel mein besonderer
Dank.

LEBENS LAUF

Am 20.10.1944 wurde ich, Gerhard Bartenbach, als Sohn des Bäckermeisters Karl Bartenbach und seiner Ehefrau Friederike, geborene Mangold, in Tailfingen geboren.

Nach 4 Jahren Volksschule in Gaildorf wechselte ich an das Progymnasium Gaildorf über, das bis zur Mittleren Reife führte. Die Oberstufe besuchte ich am Gymnasium in Schwäbisch Hall, wo ich im Frühjahr 1964 die Reifeprüfung bestand.

Von April 1964 bis März 1966 leistete ich meinen Wehrdienst bei der Bundeswehr ab.

Im Sommersemester 1966 begann ich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München mit dem Studium der Tiermedizin. Dieses beendete ich im Winter 1970/71 mit dem Staatsexamen. Im April 1971 erhielt ich meine Bestallung.

